

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



Bakalářská práce

**Analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu
exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení**

Autor práce: Barbora Čížková

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Potůčková

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavě Potůčkové za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování mé bakalářské práce věnovala.

Analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení

Souhrn

Některé mikroorganismy, mezi nimi i bakterie mléčného kvašení, mají schopnost produkovat exopolysacharidy, jež našly využití v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu i v dalších průmyslových odvětvích. Exopolysacharidy jsou rozdělovány do dvou hlavních kategorií, na homopolysacharidy a heteropolysacharidy. Pro stanovení obsahu exopolysacharidů je využíváno metod kvalitativní a kvantitativní analýzy. První zmíněný typ analytické metody podává vyhodnocení o tom, z jakých látek je analyzovaný vzorek složen. Pro podrobnější informace o zkoumaném vzorku je potřeba použít i metody kvantitativní analýzy, díky níž jsou získány podrobnosti o množství jednotlivých ve vzorku obsažených látek. K nejpoužívanějším kvalitativním analytickým metodám patří plotnové metody, viskozimetrie a mikroskopická analýza obrazu. Infračervená spektroskopie, kolorimetrie, chromatografické metody, PCR metody a spektrofotometrické metody jsou velmi používané metody analýzy kvantitativní.

Klíčová slova:

exopolysacharidy, bakterie mléčného kvašení, kvalitativní analýza, kvantitativní analýza

Analytical methods for qualitative and quantitative analysis of lactic acid bacteria exopolysaccharides

Summary

Some microorganisms including lactic acid bacteria have the ability to produce exopolysaccharides. The exopolysaccharides are used in food processing, pharmaceutical and cosmetic industry and in other industries as well. Exopolysaccharides are divided into two main categories, homopolysaccharides and heteropolysaccharides. Methods of qualitative and quantitative analysis are used for exopolysaccharide determination. The first mentioned type of analytical methods brings information about presence of the analysed compounds in the sample. For more detailed information about the analysed compounds there is a need to apply methods of quantitative analysis which are enabled to obtain details about the amount or molecular structure of these substances. The most widely used methods of exopolysaccharide qualitative analysis are plate and rheometry methods and microscopic analysis of image. Infrared spectroscopy, spectrophotometry, chromatography and PCR are frequently applied methods in quantitative analysis of exopolysaccharides.

Keywords:

exopolysaccharides, lactic acid bacteria, qualitative analysis, quantitative analysis

Obsah

1.	ÚVOD	7
2.	CÍL	8
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
3.1.	EXOPOLYSACHARIDY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	9
3.1.1	Obecná charakteristika	9
3.1.2	Dělení exopolysacharidů	10
3.1.3	Dělení exopolysacharidů dle chemické struktury	10
3.1.4	Homopolysacharidy	11
3.1.5	Heteropolysacharidy.....	14
3.1.6	Dělení exopolysacharidů dle funkce	15
3.1.7	Funkce exopolysacharidů	16
3.1.8	Faktory ovlivňující produkci exopolysacharidů.....	16
3.2.	ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ EXOPOLYSACHARIDŮ	20
3.2.1	Metody izolace exopolysacharidů	20
3.2.2	Metody kvalitativní analýzy	22
3.2.3	Metody kvantitativní analýzy	29
4	ZÁVĚR	47
5	SEZNAM LITERATURY	48
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	57

1. ÚVOD

Rostoucí poptávka spotřebitelů po přírodních, zdravých a nízkokalorických potravinách zvýšila zájem mléčného průmyslu o produkci nízkotučných a odtučněných kysaných mléčných výrobků a sýrů. Avšak odstranění tuku má několik nežádoucích účinků na jejich technologické vlastnosti. Jedná se zejména o zhoršení chuti, textury a reologických vlastností. Řešením může být použití mlékařských kultur syntetizujících exopolysacharidy, jejichž funkční vlastnosti umožní produkovat nízkotučné fermentované mléčné výrobky a sýry s parametry srovnatelnými s plnotučnou variantou. Z tohoto důvodu se v posledních letech dostaly do popředí zájmu mlékařského průmyslu mikrobiální exopolysacharidy.

Mnoho mikroorganismů má totiž schopnost syntetizovat extracelulární polysacharidy a vylučovat je ven z buňky jako rozpustné či nerozpustné polymery. Bakteriální biopolymery byly rozpoznány jako potenciálně průmyslově důležitý materiál, který postupně prokazuje ekonomicky srovnatelnou hodnotu s přírodními gumami produkovanými mořskými řasami a dalšími rostlinami. Různorodé exopolysacharidy produkované bakteriemi mají zajímavé fyzikálně-chemické vlastnosti a jsou zpravidla označovány jako ve vodě rozpustné. Mimo mlékárenství našly rozsáhlé využití v potravinovém, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu i v dalších průmyslových odvětvích.

Významný vliv má typ a množství EPS produkované BMK na texturu a reologii mléčných výrobků. K tomuto účelu byla vyvinuta řada kvalitativních i kvantitativních analytických metod.

2. CÍL

Cílem bakalářské práce je zpracování literární rešerše shrnující principy a pracovní postupy analytických metod, které jsou v současnosti používány pro kvalitativní a kvantitativní analýzu exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení. Hypotézou je, že byly vyvinuty metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení vhodné k jejich charakterizaci v matrici mléčných výrobků.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. EXOPOLYSACHARIDY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Mikrobiální polysacharidy jsou děleny do 3 základních kategorií, na intracelulární polysacharidy, stavební polysacharidy a extracelulární polysacharidy neboli exopolysacharidy (EPS). Jako EPS jsou označovány polysacharidické látky syntetizované bakteriemi a mikrobiálními buňkami vylučované do vnějšího prostředí nebo polysacharidy syntetizované extracelulárními buněčnými enzymy (Kumar et al., 2007; Ruas-Madiedo et al., 2002).

Některé kmeny bakterií mléčného kvašení vylučují polysacharidy buď přidružené k buněčné stěně bakterie, nebo tyto vypouští volně do média. Termín EPS označuje jakýkoliv typ extracelulárního polysacharidu. EPS hrají důležitou roli ve zlepšování fyzikálních vlastností fermentovaných mléčných výrobků, kde plní funkci in-vivo produkovaného stabilizátoru, emulgátoru a želírovacího činidla. Kromě toho mohou působit exopolysacharidy bakterií mléčného kvašení pozitivně na lidské zdraví. Bylo zjištěno, že některé z nich snižují hladinu cholesterolu, působí protirakovinně a mají prebiotický účinek (Kumar et al., 2007).

Historie objevu bakteriálních EPS sahá do poloviny 19. století a první zmínka je spojována s objevem EPS ve víně, který se stal později známým jako dextran. Dále byl identifikován i mikroorganismus odpovědný za jeho produkci, *Leuconostoc mesenteroides*. Pokroky ve vědě vedly k využití bakteriálních enzymů pro biosyntetická studia, takže byly objasněny podrobnosti o metabolických cestách pro utváření těchto biopolymerů (Nwodo et al., 2012).

3.1.1 Obecná charakteristika

Schopnost produkovat EPS je známa u mnoha druhů gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, hub a některých řas. Bakteriální EPS se vyskytují ve dvou základních formách (De Vuyst and Degeest, 1999; Kumar et al., 2007):

- 1) Jako kapsule (kapsulární polysacharid), která je sdružena s povrchem buňky a může být kovalentně vázána.
- 2) Jako sliz, který je volně exkretovaný do okolí buňky bez nutnosti se na ni pevně vázat (táhlavité BMK). Výskyt slizuje je připisován koloniím bakterií pěstovaných na agarových médiích v laboratořích (Kumar et al., 2007).

Kapsulární polysacharidy jsou charakterizovány dle bakteriální serotypizace jsou založené na reaktivitě specifických protilátek, často tvořených i u vyšších živočichů, za použití refe-

renčních kmenů určitých druhů bakterií. Strukturální diverzita polysacharidů vede k různým reakcím protilátek, což se odráží v nálezů velkého počtu serotypů zjištěných u bakterií téhož druhu (Kumar et al., 2007).

Vanhooren a Vandamme (1998) zjistili, že EPS mohou být vázány k buněčné stěně jen v omezeném počtu míst. Povrchové vrstvy kovalentně vázaných polysacharidů jsou anatomicky umístěny jako nejsvrchnější krytí buněk bakterií. Povaha a složení kapsulárních polysacharidů je závislá na kmenu a strukturální rozmanitost je vysoká. Například u kmene *Escherichia coli* bylo charakterizováno více než osmdesát různých druhů kapsulárních EPS (Looijesteijn et al., 2000; Schembri et al., 2004).

EPS tvořící sliz pak mohou být propojeny s molekulami polysacharidů o specifické délce, jež jsou ukotveny v buněčné stěně (Kumar et al., 2007).

Historie objevu bakteriálních EPS sahá do poloviny 19. století a první zmínka je spojována s objevem exopolysacharidu ve víně, který se stal známým jako dextran. Později byl identifikován i mikroorganismus odpovědný za jeho produkci *Leuconostoc mesenteroides*. Pokroky ve vědě vedly k využití bakteriálních enzymů pro biosyntetická studia, takže byly objasněny podrobnosti o metabolických cestách pro utváření těchto biopolymerů (Nwodo et al., 2012).

3.1.2 Dělení exopolysacharidů

Kategorizace EPS je komplikovaná. Jejich velká rozmanitost umožňuje rozdělení do kategorií, které je založené na odlišné chemické struktuře, molekulární hmotnosti a typu vazby. Druhým hlediskem pak je dělení dle funkce (Nwodo et al., 2012).

3.1.3 Dělení exopolysacharidů dle chemické struktury

EPS bakterií mléčného kvašení (BMK) jsou jednoduché nebo složené polysacharidy. Mimo sacharidových jednotek mohou zahrnovat také širokou škálu proteinů, glykoproteinů a glykolipidů, v některých případech i extracelulární DNA (Nwodo et al., 2012).

Z chemického složení vyplývá, že EPS se mohou dělit na dvě základní skupiny, homopolysacharidy (HoPS) a heteropolysacharidy (HePS). HoPS jsou tvořeny jen jedním typem monosacharidů, zatímco HePS jsou složeny z několika opakujících se základních stavebních jednotek, které se liší svou velikostí, jež jde od disacharidů až po heptasacharidy (Nwodo et al., 2012).

Rozdíly mezi HoPS a HePS však nejsou jen v jejich chemickém složení a spojení základních stavebních jednotek, nýbrž i v enzymech syntézu katalyzujících. Množství vyprodukova-

ných EPS je závislé na druhu mikroorganismu a dále pak také na růstových podmínkách zahrnujících pH, teplotu, inkubační dobu a kompozici zdrojů uhlíku, dusíku a kationtů (Heumann et al., 1994).

3.1.4 Homopolysacharidy

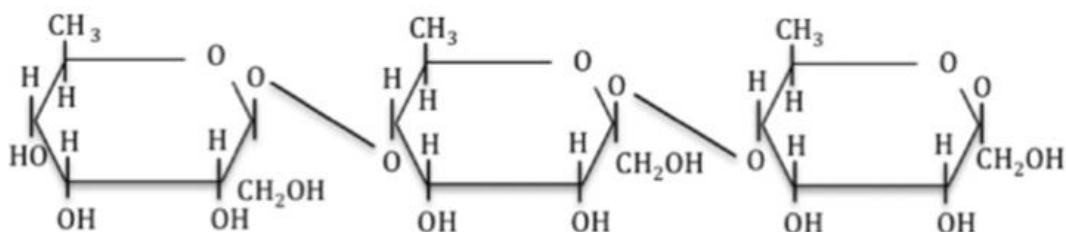
HoPS jsou syntetizovány extracelulárně nebo buněčnou stěnou vázanou glykansacharózou využívající sacharózu jako glykosylový donor. Tento typ polysacharidů je dle stavebních jednotek rozdělen do třech základních skupin. Jedná se o glukany skládající se z glukózy, fruktany sestávající z fruktózy a méně frekventované galaktany z galaktózy. V závislosti na molekule akceptoru je možná i produkce oligosacharidů. Glukany lze dále rozdělit do dvou podskupin dle typu vazby na α -D-glukany a β -D-glukany (Stewart-Tull, 1980; Nwodo et al., 2012; Petit, 2005; Roger, 2002).

3.1.4.1 Dextran

Příkladem syntézy HoPS je syntéza dextransu, který se skládá z jednotek glukózy spojené α (1-6)-vazbou, s větvením α (1-2)- nebo α (1-3)-. Dextransy jsou syntetizovány gram-pozitivní bakterií *Leuconostoc* sp., a tato reakce je katalyzována enzymem dextransacharózou, známým také jako D-glykosyl-transferáza (Donot et al., 2012).

3.1.4.2 Levan

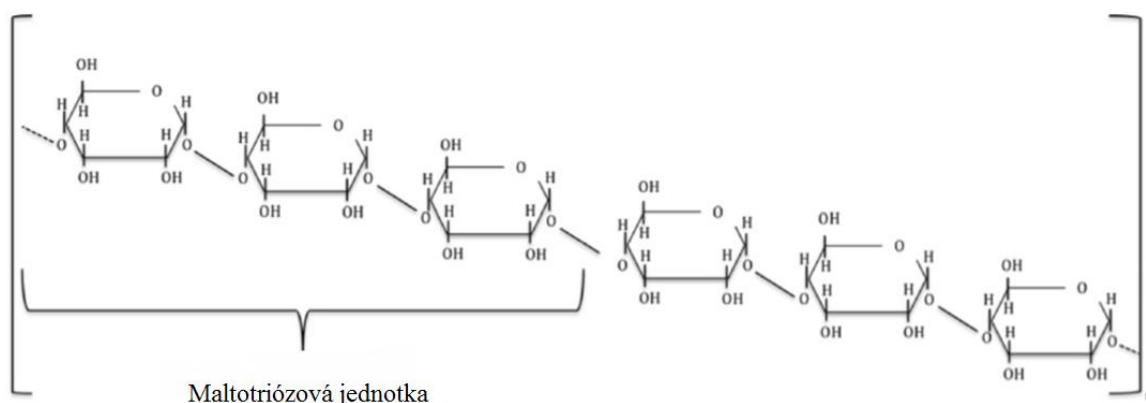
Známým HoPS syntetizovaným mimo buňku je levan skládající se z D-fruktózy spojené β (2-6)-glykosydovou vazbou. Jeho struktura je znázorněna na obr. 1. Levan může být získáván fermentací sacharózy bakteriemi například *Zymomonas mobilis* nebo *Bacillus subtilis* či enzymatickou syntézou využívající sacharózu jako substrát. Biosyntéza levanu je závislá na extracelulárním enzymu levansacharóze, známému též jako sacharóza-6-fruktosyltransferáza, β (2-6)-fruktosyltransferáza a β (2-6)-fruktóza. Levansacharózu produkuje množství gram-pozitivních (G^+) bakterií zahrnujících *Bacillus* sp., a gram-negativních (G^-) bakterií, kam patří *Z. mobilis*. Levansacharóza je extracelulární enzym, jehož funkcí je katalyzovat syntézu levanu transfruktosylací sacharózy. Enzym se před vyloučením hromadí v periplazmě. Optimální teplota pro syntézu levansacharózy závisí na kmenu bakterií. Pro *Z. mobilis* je ideální teplota 0 °C, zatímco pro *B. subtilis* se jedná o 10 °C. V extracelulárním prostředí je levansacharóza produkována za kyselého pH. Její aktivita může být potlačena přítomností glukózy v živném médiu a teplotami nad 45 °C (Donot et al., 2012; Monsan et al., 2001; Shih et al., 2010).



Obr. 1: Chemická struktura levanu (Donot et al., 2012).

3.1.4.3 Pullulan

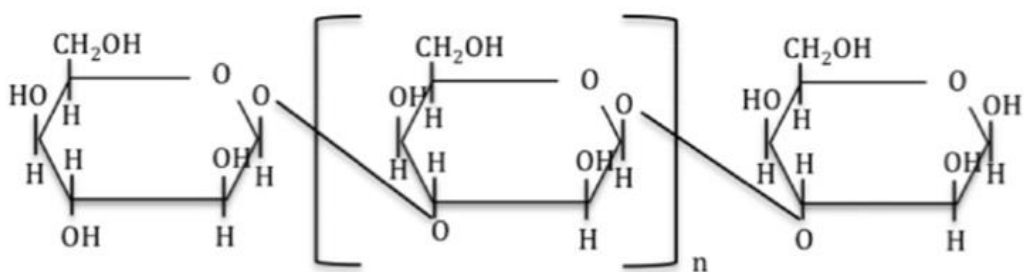
Pullulan je lineární HoPS složený z glukózy. Ve většině případů je popisován jako polymer složený z maltotriózových sekvencí jednotek následujících vazeb: $\alpha(1-4)$ -Glu- $\alpha(1-4)$ -Glu- $\alpha(1-6)$ -Glu. Vyskytují se zde i jiné typy vazeb, jako sekvence jednotek maltotetraózy: $\alpha(1-4)$ -Glu- $\alpha(1-4)$ -Glu- $\alpha(1-6)$ -Glu- $\alpha(1-6)$ -Glu. Struktura molekuly je znázorněna na obr. 2. Pullulan je jako jediný zmíněný produktem plísní, ne BMK. Na rozdíl od levanu je biosyntetizován v cytosolu a poté vyloučen do mimobuněčného prostředí. Bylo provedeno mnoho studií za účelem definování optimálních podmínek pro syntézu pullulanu. Z nich vyplynulo, že maximální syntéza pullulanu nastává při pH 4,5, ačkoli nejrychlejší růst plísně *Aspergillus pullulans* byl zaznamenán při pH 6,5. Optimální teplota pro produkci pullulanu je závislá na kmenu *A. pullulans* a pohybuje se v rozmezí od 24 do 30 °C. Produkci EPS ovlivňují také stopové prvky, jako jsou vitamíny zahrnující biotin a thiamin a minerály (chlór, mangan a železo). Fáze růstu a stáří kultury mají na syntézu pullulanu též vliv. Hlavní roli v jeho produkci však hraje výběr zdroje uhlíku, kterým může být glukóza, sacharóza nebo dextran, a jeho koncentrace v živném médiu. Ravella a kol. (2010) uvádí, že sacharóza je ohledně stimulace produkce EPS efektivnější než glukóza, fruktóza, xylóza nebo celobióza. Produkce pullulanu se liší v rámci kmenů *A. pullulans* v rozmezí od 1,3 g.l⁻¹ do 52,5 g.l⁻¹ (Donot et al., 2012; Jiang, 2010; Wu et al., 2009).



Obr. 2: Chemická struktura pullulanu (Donot et al., 2012).

3.1.4.4 Curdlan

Curdlan je lineární HoPS bez větvení. Skládá se ze 400 až 500 zbytků *D*-glukózy spojených $\beta(1-3)$ -glykosidovými vazbami. Základní stavební jednotka tohoto EPS je znázorněna na obrázku 3. Curdlan je produkován převážně kmeny *Agrobacterium* sp., například *Agrobacterium radiobacter*. Hlavními faktory ovlivňujícími jeho produkci jsou koncentrace živin, zejména uhlíku, dusíku a fosforečnanů, pH živného média a jeho provzdušnění. Jin a kol. (2008) uvádí optimální pH o hodnotě 7 pro kultivaci *Agrobacterium* sp. a pro produkci curdlanu pH 4,5 společně s optimální teplotou mezi 30 až 32 °C. Bylo prokázáno, že nedostatek dusíku je spojen s produkcí EPS během stacionární fáze růstu. Hlavním průmyslovým zdrojem uhlíku užívaným k produkci curdlanu je v dnešní době glukóza. Dalšími zdroji energie vhodnými pro produkci tohoto HoPS jsou taktéž sacharóza a melasa (Donot et al., 2012).

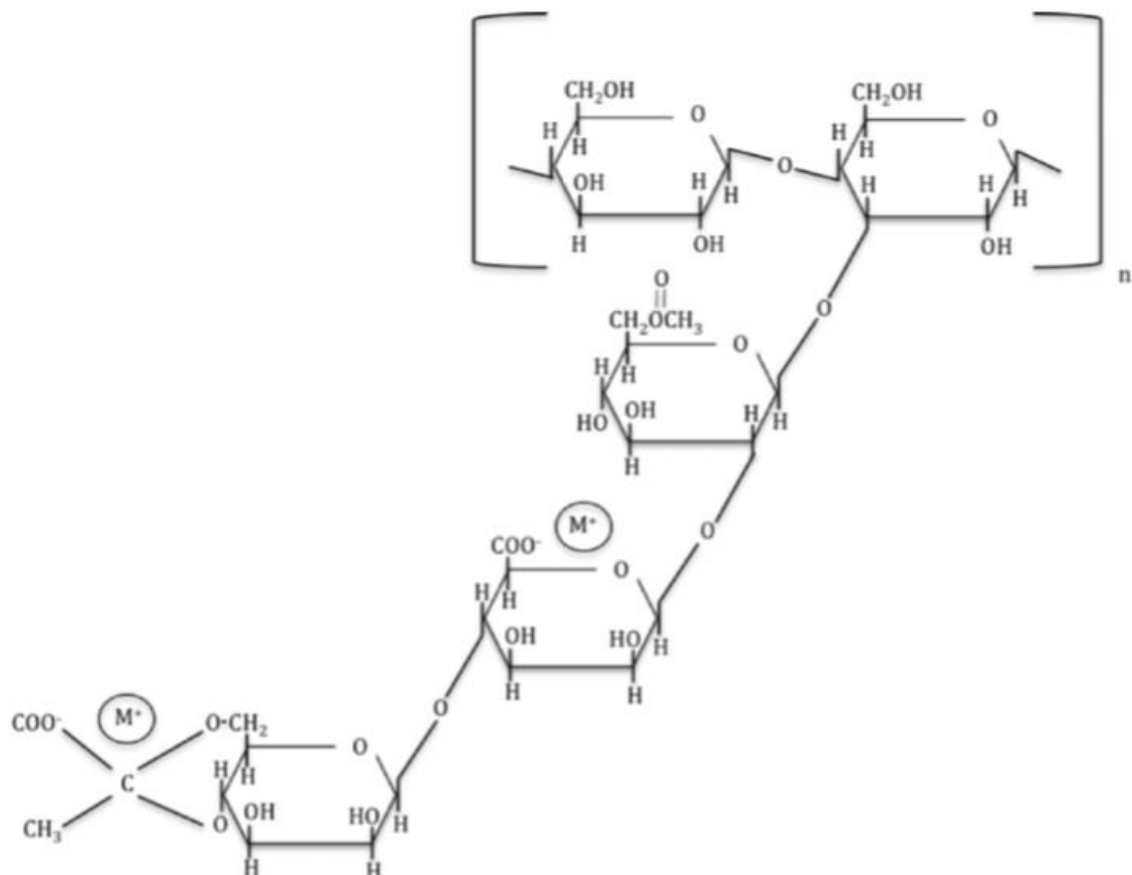


Obr. 3: Chemická struktura curdlanu (Donot et al., 2012).

3.1.5 Heteropolysacharidy

Mechanismus biosyntézy HePS je složitější než u homopolysacharidů. Opakující se jednotka je produkována vnitrobuněčně pomocí nukleotidů cukru jako prekurzoru molekul a poté je transportována skrz buněčnou membránu, polymerována a nakonec vypuštěna do média. Mezi shluky genů HePS odlišných BMK byla zjištěna překvapivá podobnost. Jedná se o genové shluky, které jsou bezpečně uchovány v oblasti konce 5', kde je kód pro regulaci, určení délky řetězce, biosyntézu opakující se jednotky, polymeraci a export (Jolly and Stingle, 2001; Broadbent et al., 2003). Ve struktuře HePS lze nalézt jednotky *D*-glukózy, *D*-galaktózy, *L*-rhamnózy a v některých případech i *N*-acetylglukosaminu, *N*-acetylgalaktosaminu nebo glukuronové kyseliny (Ruas-Madiedo et al., 2002). Monomerní jednotky EPS jsou spojeny nejčastěji $\alpha(1,4)$ -, $\alpha(1,6)$ - a $\alpha(1,2)$ - vazbami. První zmíněné spojení je charakterizováno značnou tuhostí, druhé dvě vazby jsou více pružné (Martinez-Martinez et al., 1993). Jedním z nejvíce studovaných HePS je xanthan, produkováný *Xanthomonas campestris*. Je složen z 2 - 8 opakujících se jednotek monomerů. Základní stavební jednotka, znázorněná na obrázku 4, je tvořena ze dvou *D*-glukóz, dvou *D*-manóz a *D*-glukuronové kyseliny. Molekulární hmotnost tohoto EPS je vysoká, pohybuje se v rozmezí od 500 do 2 000 kDa, v závislosti na bakteriálním rodu a druhu. Jeho biosyntéza začíná shromážděním opakujících se pentasacharidových jednotek. Ty jsou poté polymerizovány pro produkci makromolekuly (Donot et al., 2012).

Optimální teplota pro produkci xanthanu se pohybuje mezi 30 až 33 °C. Nejvyšší produkce byla zaznamenána při neutrálním pH, tedy mezi hodnotami 6 až 8 (Garcia-Ochoa et al., 2000; Vandamme et al., 2002). Kalogiannis a kol. (2003) ve své studii prokázali, že *X. campestris* vylučuje xanthan o koncentraci 53 g.l⁻¹ za podmínek růstu v přítomnosti melasy a dihydrogenfosforečnanu draselného. Bylo zjištěno, že při růstu za přítomnosti glukózy dochází k poklesu koncentrace xanthanu na 40 g.l⁻¹. *X. campestris* je striktně aerobní bakterie, z čehož vyplývá, že rozhodujícím faktorem je množství kyslíku. Může být zvyšováno mícháním dané kultury (Kalogiannis et al., 2003; Vandamme et al., 2002).



Obr. 4: Chemická struktura xanthanu (Donot et al., 2012).

3.1.6 Dělení exopolysacharidů dle funkce

Dělení EPS podle funkce je oblast, která je intenzivně zkoumána. EPS lze například rozdělit do sedmi kategorií navrhovaných Flemmingem a kol. (2010) na stavební, vazebné, aktivní, povrchově aktivní, redoxně aktivní, informativní a výživové (Flemming et al., 2010; Nwodo et al., 2012). Nicméně, koncept předložený Flemmingem a kol. (2010) nezahrnuje jednoznačně skupiny EPS podílejících se na biocidní rezistenci. S ohledem na výše uvedenou klasifikaci byly do kategorie stavebních EPS zahrnuty biomolekuly neutrálních polysacharidů, protože se účastní výstavbových procesů a v matrixu slouží k zadržování vody a ochraně buněk. Vazebné EPS jsou molekuly s kladným či záporným nábojem, jejichž úkolem je vazba na jiné nabitě molekuly zapojené do interakcí na buněčném povrchu. Povrchově aktivní EPS obsahují molekuly s amfifilním charakterem, jež mají různé chemické struktury a povrchové vlastnosti. Mohou být

například zapojovány do tvorby biofilmů nebo je u nich rozvinuta antibakteriální a antimykotická aktivita (Esko, 1999; Flemming et al., 2010; Schembri et al., 2004).

3.1.7 Funkce exopolysacharidů

Přesná role EPS u mikroorganismů tyto látky produkující je patrná v různých ekologických nikách a závislá na jejich životním prostředí. Produkce EPS je přímou reakcí na tlak selektivního prostředí, jako je teplota či intenzita světla. Tyto EPS ovlivňují způsob, kterým na sebe působí mikroorganismy s vnějším prostředím - pevným či kapalným (Donot et al., 2012; Kumar et al., 2007).

EPS většinou nezajišťují energetické rezervy, jejich hlavní rolí je chránit buňku v prostředí. Vrstva obklopující extracelulární polysacharidy se vyznačuje vysokým obsahem vody, což mikroorganismům zajišťuje odolnost proti vyschnutí a predaci prvky. Navíc anionická povaha vnější polysacharidové vrstvy pomáhá zachytit nezbytné minerály a živiny, čímž EPS umožňují mikrobiální flóře udržovat ve svém nejbližším okolí dostatek živin, jež tvoří substrát pro růst mikroorganismů. Obal polysacharidů také reguluje difúzi určitých molekul mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím. Tato regulovaná difúze dodává některým bakteriím odolnost vůči detergentům a antibiotikům. Mikroorganismy jsou také často sdružovány v biofilmy o vysoké buněčné hustotě. Nezbytným pro formaci biofilmu je tzv. „glykocalyx“, složený převážně z EPS. EPS mohou ovlivňovat stabilitu a adhezivitu biofilmu díky interakcím v rámci řetězců polysacharidů. Utváření biofilmu může podporovat navíc i sdružování různých mikrobiálních druhů jako je tomu v případě střevní sliznice (Donot et al., 2012).

3.1.8 Faktory ovlivňující produkci exopolysacharidů

Parametry, které ovlivňují produkci EPS BMK v největší míře jsou bakteriální kmen, složení média (zdroje uhlíku, dusíku a přítomnost dalších růstových faktorů) a podmínky kultivace, tedy teplota, čas, pH a tlak kyslíku (Nampoothiri et al., 2003, Lee and Gilmore, 2005).

Mnoho BMK syntetizuje jako EPS dextran. V přítomnosti sacharózy v živném médiu se dextran pak stává hlavním zdrojem uhlíku. Tento mechanismus je častým jevem zejména u bakteriálního rodu *Leuconostoc*. Ostatní cukry jako jsou glukóza, fruktóza, mannóza a laktóza podporují růst bakterií, které neprodukují enzym štěpící dextran (Cavenaghi, 2000).

Dalším kritickým faktorem pro syntézu EPS je teplota. Vyšší růst a větší produkce EPS se u mezofilních bakterií vyskytuje v rozmezí od 25 do 35 °C. Při optimální teplotě růstu studie

prokázaly, že kmeny termofilních bakterií mléčného kvašení jako jsou *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* vykazují lepší produkci EPS při 42 °C (Vermani et al., 1995, Prasanna et al., 2012).

Studiu vlivu kultivačních podmínek na produkci EPS se zabývali mezi jinými i Paulo a kol. (2012). Jejich výsledky zobrazuje tabulka 1 (Paulo et al., 2012).

Tabulka 1: Vliv složení kultivačního média, pH, teploty a doby kultivace na produkci EPS BMK (Paulo et al., 2012).

Sacharid	pH	Teplota [°C]	Doba kultivace [dny]	Počet EPS ⁺ izolátů ¹
Sacharóza	5,5	28,0	7	15
		35,0	2	13
		45,0	1	10
	7,5	28,0	7	42
		35,0	2	13
		45,0	1	6
Glukóza	5,5	28,0	7	7
		35,0	2	9
		45,0	1	1
	7,5	28,0	7	14
		35,0	2	7
		45,0	1	1
Laktóza	5,5	28,0	7	10
		35,0	2	9
		45,0	1	7
	7,5	28,0	7	15
		35,0	2	5
		45,0	1	7

¹ izoláty z kravského a koziho mléka, cukrové třtiny, manioku a zelí

Paulo a kol. (2012) studovali celkem 191 izolátů BMK. Z výsledků uvedených v tabulce 1 vyplývá, že na médiu obsahujícím sacharózu vykazuje 51,8 % sledovaných kmenů BMK produkci EPS, z nichž většina (42,4 %) byla produkována při 28 °C a pH 7,5. Druhé nejvyšší množství EPS⁺ kmenů pak bylo zaznamenáno při použití kultivačního média obsahujícího laktózu. Zde byla úspěšnost 27,7 %, z níž 28,3 % opět při teplotě 28 °C a pH 7,5. Na médiu obsahujícím glukózu produkovalo EPS jen 20,4 % kmenů, z nichž 35,9 % opět za stejné teploty a pH, které byly označeny za nejvhodnější u předešlých 2 zdrojů uhlíku. Jako optimální podmínky pro produkci EPS BMK byly v této studii shledány základní médium doplněné sacharózou o pH 7,5 a teplota kultivace dosahující 28 °C (Paulo et al., 2012).

3.2. ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ EXOPOLYSACHARIDŮ

Analytická chemie je vědní disciplína, jejíchž metod je užíváno především ke zjišťování chemického složení vzorku. K tomu využívá poznatky obecné, anorganické i organické chemie, fyziky, biologie, matematiky, popř. dalších vědních oborů. V rámci analytické chemie je rozlišována kvalitativní a kvantitativní analýza. Pomocí kvalitativní analýzy je zjišťováno, ze kterých součástí se analyzovaná látka skládá, zatímco analýza kvantitativní stanovuje jejich vzájemný poměr. Analýza kvantitativní následuje zpravidla až po analýze kvalitativní (Holzbecher et al., 1987).

3.2.1 Metody izolace exopolysacharidů

K získávání EPS jsou užívány chemické metody, fyzikální metody a kombinace obou uvedených. Tyto odlišné způsoby získávání EPS mohou být porovnávány z hlediska dvou kritérií, a to kvality a kvantity získaných EPS. Extrakční metody jsou založeny na převodu zkoumané látky z jedné fáze do druhé na základě její rozpustnosti. Jedná se buď o extrakci fyzikálními metodami, nebo chemickými látkami. Různými rozpouštědly se extrahují buď tuhé látky (používá se především u přírodních materiálů v organické chemii a biochemii) nebo se látka rozpouštěná v určitém rozpouštědle, většinou ve vodě, extrahuje vhodným s vodou nemísitelným organickým rozpouštědlem. Druhý zmíněný způsob je významný v analytické chemii pro oddělení stanovené látky od látek interferujících (Kalous et al., 1987). Nevýhodou předúpravy vzorků extrakcí EPS je nebezpečí kontaminace chemickými činidly či interferujícími složkami z živného média a buněk. Během extrakce EPS může docházet k různému rozpadu buněk, který je jen obtížně vyhodnotitelný. Jednou z možností je stanovení stupně přírůstku proteinů a nukleových kyselin v EPS, nebo analýza specifických intracelulárních sloučenin. Izolační metody mohou též narušit makromolekuly EPS a tím ovlivnit i jejich složení a vlastnosti (Donot et al., 2012).

V praxi izolační procesy zpravidla kombinují několik technik. V současnosti neexistuje jednoduchá metoda izolace pro kvalifikaci a kvantifikaci všech mikrobiálních EPS. Izolační technika musí být vybrána a optimalizována pro každý jednotlivý případ a musí být brán ohled na charakteristické rysy EPS, které izolujeme. Daná metoda musí být také vybírána podle konečného záměru, a to kvalitativní či kvantitativní analýzy. Kombinované a opakující se extrakce jsou většinou nutné pro znovuzískání všech zlomků EPS obsažených v buněčné hmotě a růstovém médiu (Donot et al., 2012).

3.2.1.1 Extrakce exopolysacharidů chemickými činidly

Pro extrakci EPS jsou používána následující rozpouštědla a jejich směsi. Extrakce EPS pomocí rozpouštědel pracuje na principu rozdílné rozpustnosti a polaritě složek vzorků. Extrakční metody založené na výměně kationtů (zejména hořčíku a vápníku) se ukázaly být vysoce selektivními pro izolaci EPS. Do této kategorie patří i tzv. „CER“ (Cation Exchange Resin) extrakce využívající pryskyřice, jež jsou široce uplatnitelné z důvodu jednoduchého odstranění pryskyřice a nemožnosti znečištění EPS chemickými činidly. Extrakce alkalická (například směsí NaOH a formaldehydu) umožňuje získat až 75 % organické hmoty. Při porovnání tohoto postupu s CER extrakcí bylo zjištěno, že metoda má až třikrát vyšší výtěžnost. Její nevýhodou je riziko modifikace složení a tím i vlastností polymeru a těžké poškození buněk mikroorganismů. Alkalická extrakce může být s výhodou nahrazena metodou používající kalafunu. Bylo prokázáno, že množství EPS extrahovaných pomocí kalafuny ($158 \pm 3 \text{ mg.g}^{-1}$) bylo téměř shodné jako při reakci s formaldehydem a hydroxidem sodným ($150 \pm 3 \text{ mg.g}^{-1}$). Kyselá extrakce prováděná pomocí ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) má také vysokou účinnost a čistotu izolátu, avšak opět při ní dochází k mírné lýze buněk (Donot et al., 2012).

Metody izolace dialýzou poskytují spolehlivé výsledky, ale jejich aplikace není vyhovující, jelikož je časově náročná a vyžaduje specifické vybavení, které dělá proces analýzy u některých vzorků velmi komplikovaným. Při použití metody zpětného vysrážení fermentovaných produktů nastává problém srážení proteinů, které komplikuje eliminaci reziduální laktózy (Rimada and Abraham, 2003).

3.2.1.2 Izolace exopolysacharidů fyzikálními metodami

Mezi metody fyzikální extrakce EPS patří odstředování, ošetření ultrazvukem, mikrovlnným zářením, záhřev nebo membránová separace. Obvykle je účinnost fyzikálních metod nižší než u extrakce chemickými rozpouštědly. Mnoho autorů však poukazuje na skutečnost, že fyzikální metody ovlivňují pouze molekulární hmotnost EPS a jsou tedy vhodné pro přípravu vzorků na chromatografické analýzy. Mnoho studií bylo provedeno k optimalizování podmínek izolace EPS ultrazvukovým ošetřením kombinovaným se záhřevem (sledována teplota, čas a pH) za přítomnosti dalších činidel (ethanol, ozón) (Donot et al., 2012).

3.2.2 Metody kvalitativní analýzy

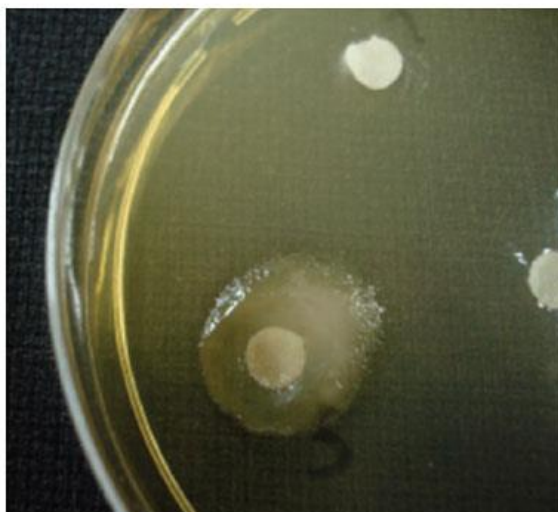
Cílem kvalitativní analýzy je získat informace o tom, z jakých složek (sloučeniny, prvky, ionty, radikály) je vzorek složen. Pro bližší určení charakteru analyzovaného materiálu je potřeba analýzy kvantitativní, jež je popsána v kapitole 3.2.3 (Garaj et al., 1987).

Pro kvalitativní analýzu EPS BMK jsou s výhodou využívány následující metody: plotnové metody, viskozimetrie, chromatografické metody (jež ale náleží i do kvantitativních metod, kde jsou zmíněny) a mikroskopické analýzy obrazu (Paulo et al., 2012; Ayala-Hernández, 2008; Hassan et al., 2002; Van der Meulen et al., 2007).

3.2.2.1 Plotnové metody

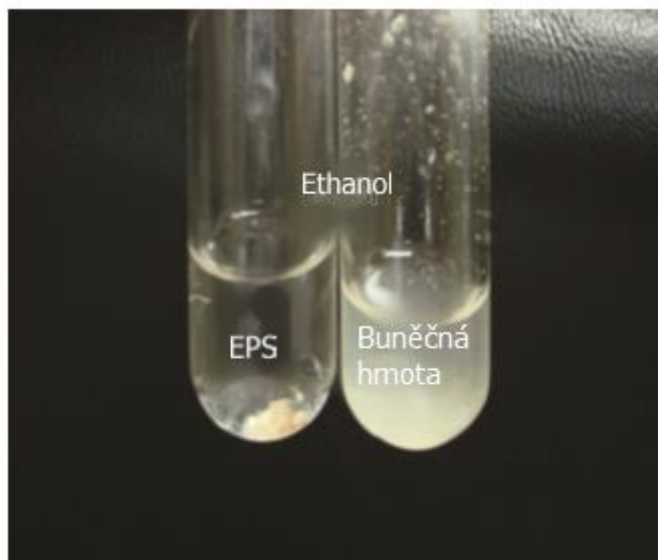
Pravděpodobně nejjednodušším způsobem průkazu produkce EPS je porovnávání charakteru mikrobiálních kolonií na vhodných agarových půdách pomocí zraku. Bohužel, tato metoda je pouze orientační, neboť je velmi málo citlivá. Lze při ní rozpoznat kmeny BMK, které produkují jen velké množství EPS nebo jsou táhlovité (Smitinont et al., 1999; Welman et al., 2003).

Plotnovou metodu analýzy produkce EPS BMK využili ve své práci mimo jiných i Paulo a kol. (2012). Byla provedena izolace BMK z 5 druhů potravinových matric, z kravského a kozího mléka, cukrové třtiny, manioku a zelí, kultivovaných na sterilních filtračních papírech umístěných na živném médiu. Izoláty byly kultivovány v různých podmínkách lišících se druhem cukru v živném médiu (sacharóza, glukóza, laktóza), pH ($5,5 \pm 0,2$ nebo $7,5 \pm 0,2$) a teplotou (28 ± 2 °C, 35 ± 2 °C a 45 ± 2 °C). Kultivace probíhala po dobu 7 dnů při teplotě 28 °C, po dobu 48 hodin při 35 °C a po dobu 24 hodin za teploty 45 °C. Po skončení inkubace byla produkce EPS hodnocena na základě utvoření mukoidních zón okolo filtračních papírů (viz obrázek 5). Produkce EPS pak byla potvrzena smícháním části mukoidní hmoty s 2 ml čistého ethanolu, jak je znázorněno na obrázku 6. Dále bylo sledováno nasycení papírů slizovitou hmotou pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Paulo et al., 2012).



Obr. 5: Průsvitná kolonie produkující EPS (Paulo et al., 2012).

V této studii bylo získáno celkem 191 izolátů EPS⁺ BMK. Technika screeningu EPS BMK použitá Paulem a kol. (2012) byla spolehlivá, avšak časově i materiálově náročná. Screening mikroorganismů produkujících EPS byl prováděn ve zkumavkách obsahujících kapalinu nebo na agarových půdách. Obě možnosti vyžadovaly velké množství média a nádobí. Výsledky studie jsou zobrazeny v tabulce 1 v kap. 3.1.8 (Paulo et al., 2012).



Obr. 6: Potvrzení produkce EPS smícháním kolonií s ethanolem (Paulo et al., 2012).

3.2.2.2 Viskozimetrie

Principem viskozimetrické metody je měření viskozity kapaliny pomocí jejího toku kapilárrou, nebo rychlosti sedimentace tělesa o známé hmotnosti. Působením vnějších mechanických sil dochází k deformaci kapaliny. Deformace může být vratná, tedy vymizí po odstranění vnější síly (elastické chování), nebo dochází k toku kapaliny, který se zastaví až v případě, je-li síla odstraněna (viskozí chování). Poslední možností deformace je stav, kdy odezva systému záleží na době, po kterou tato síla působí (viskoelastické chování) (Kalous et al., 1987).

Pro screening produkce EPS BMK může být použita viskozimetrická analýza tekutého živného média během nebo po fermentaci. Tato metoda je však ovlivněna změnami viskozity díky ostatním vlivům, jako například přírůstkem biomasy (Vandenberg et al., 1993; Sanni et al., 2002).

Ve studii autorů Ayala-Hernándeze a kol. (2008) byl použit vysoce táhlovitý bakteriální kmen rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (JFR1), jež byl zaočkován v množství 2 % do permeátu odstředěného mléka s různým přídatkem syrovátkových bílkovin (0 %, 0,5 %, 1 % a 2 %) (Hassan et al., 2003).

Vliv produkce EPS na reologické vlastnosti fermentačního média byl testován měřením viskozity při různých fermentačních časech za použití rotačního reometru se systémem soustředěných válců. Principem této metody je stanovení pootočení statického válce od původní polohy vlivem konstantního otáčení druhého válce, díky kterému je vnitřním třením kapaliny přenášen otáčivý moment na statický válec. Pootočení statického válce je úměrné úhlové rychlosti otáčejícího se válce a viskozitě kapaliny. Podmínky metody byly následující: šířka mezery 5,9 mm, poloměr rotace 15 mm, objem vzorku 20 ml, teplota 4 °C, smyková rychlost 0,1 až 100 s⁻¹. Vzorky byly ekvilibrovány při 4 °C do doby měření a těsně před ním homogenizovány (Ayala-Hernández et al., 2008).

Dále byla stanovena viskozita roztoků přečištěných EPS. Analýza proběhla po rozpuštění izolátů v permeátu odstředěného mléka po ultrafiltraci (11 % hm. sušiny) při 2 různých hodnotách pH, a to při 6,7 a 5,5 (aktivní kyselost byla upravena pomocí HCl) o různém přídatku syrovátkových bílkovin (0 %, 0,5 %, 1 %, a 2 %). Mléčný permeát byl zvolen z důvodu dobré rozpustnosti, aby bylo minimalizováno kolísání složek sušiny rozpouštědla. Roztoky EPS byly po smíchání s permeátem ponechány přes noc k zajištění jejich adekvátní hydratace. Viskozita byla měřena ve čtyřech koncentracích EPS (0,0625; 1,25; 2,5 a 5 mg.ml⁻¹) rotačním reometrem v systému kužel-deska. Tento viskozimetr umožňuje měřit úhel pootočení (úměrný napětí) v závislosti na rychlosti otáčení (úměrná rychlosti deformace). Podmínky metody byly následující-

cí: délka měření 5 min, smyková rychlost 0,1 až 200 s⁻¹, úhel kužele 2 °, šířka mezery 51 μm, teplota 4 °C. Vzorky byly před vlastní analýzou temperovány 10 min při 4 °C (Ayala-Hernández et al., 2008).

Z výsledků měření vyplynulo, že se zvyšující se koncentrací EPS se zvyšovala i viskozita materiálu. Při nízkých koncentracích EPS nebyl rozdíl mezi jednotlivými hodnotami pH. Při vyšších koncentracích EPS byl pozorován statisticky významný rozdíl ve viskozitě vzorků. Reologické rozdíly roztoků EPS v mléčném permeátu byly nejvíce znatelné při nejvyšší koncentraci, tedy 5 mg.ml⁻¹. Viskozita roztoků EPS klesala se zvyšujícím se přidavkem syrovátkových bílkovin. Na druhou stranu, ve fermentovaném médiu viskozita permeátů obohacených o syrovátkové bílkoviny byla značně vyšší než u těch neobohacených. Toto naznačuje, že reologický příspěvek EPS produkovaných *in vivo* může být odlišný od vlivu EPS přidaných do výrobků po fermentaci a může být vysvětlen např. interakcemi mezi EPS a proteiny v průběhu fermentace (Ayala-Hernández et al., 2008).

Viskozita roztoku o koncentraci 5 mg.ml⁻¹ přečištěných EPS produkovaných při pH 6,5 byla významně vyšší než při pH 5,5. Viskozita fermentovaného média byla však mnohem vyšší při obou hodnotách pH. To může být vysvětleno odlišným množstvím EPS produkovaných během fermentace *in vivo* a jejich interakcemi s mléčnými bílkoviny. Je také důležité přihlídnout k tomu, že proces izolace může ovlivňovat strukturu, náboj a funkci EPS. Pokud jsou EPS ve fermentovaném médiu, jsou vysoce hydratované a interagují s proteiny. Také pH média se může podílet na těchto interakcích (Ayala-Hernández et al., 2008).

Výhodou viskozimetrické metody je její rychlost a jednoduchost provedení, která nevyžaduje předúpravu vzorku.

3.2.2.3 Mikroskopická analýza obrazu

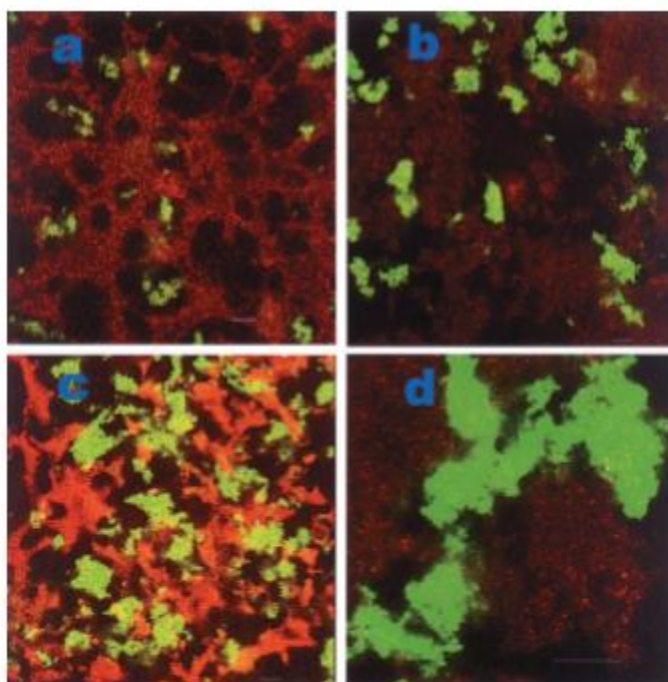
Přímé mikroskopické pozorování je potenciálně užitečný a jednoduchý přístup k získání informací, které pomáhají lépe pochopit funkce EPS v mléčných výrobcích. Pro analýzu EPS je obvykle používána skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie (SEM) a konfokální laserová mikroskopie (CLM). SEM vyžadují přípravu vzorku vysušením a obě metody používají odlišná barviva pro vizualizaci preparátů. SEM byla použita při zkoumání mléka fermentovaného kulturami produkujícími EPS (Kalab et al., 1983; Schellhaass and Morris, 1985; Teggatz and Morris, 1990).

Autory Hassanem a kol. (2002) byla vyzkoušena metoda CLM. Jako vzorky byly použity fermentovaná mléka vyrobená za nízké teploty z mléka odstředěného. Naočkována byla 2 %

inokula následujících EPS⁺ kultur: jogurtová kultura s táhlovitým rodem *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 (Chr. Hansen, Denmark) a netáhlovitým rodem *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC 769 (Chr. Hansen), 4 % inokula EPS⁺ bakterie *Lactococcus lactis* CHCC 3367 (Chr. Hansen). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C, kromě *Lactococcus lactis*, kde fermentace probíhala při teplotě 25 °C. Po koagulaci bylo mléko udržováno při teplotě 5 °C po dobu 24 h až do mikroskopického pozorování, jež bylo realizováno následujícího dne. Jako další matrice byl použit sýr feta vyrobený za použití EPS⁺ (Hassan et al., 2002).

K vizualizaci EPS byl použit konjugovaný aglutinin s Alexa fluorem 488 (fermentované mléko) a konkanavalin A (sýr feta). Excitační a emisní vlnové délky pro konjugovaný aglutinin i konkanavalin A se rovnaly 519 nm a 495 nm. Zásobní roztok konkanavalinu A byl připraven rozpuštěním 5 mg látky v 5 ml 0,1 M roztoku hydrogenuhličitanu sodného o pH 8,3 a byl uchováván při teplotě -20 °C. Pracovní roztok byl připraven zředěním zásobního roztoku v poměru 1:20 syrovátkou získanou po odstředění kousku sýru z důvodů zabránění výkyvům pH a osmolarity. Pracovní roztok pro konjugovaný aglutinin byl připraven zředěním zásobního roztoku (1 mg barviva v 1 ml fosfátového pufru při pH 6,8) v poměru 1:5 za pomoci syrovátky fermentovaného mléka (Hassan et al., 2002).

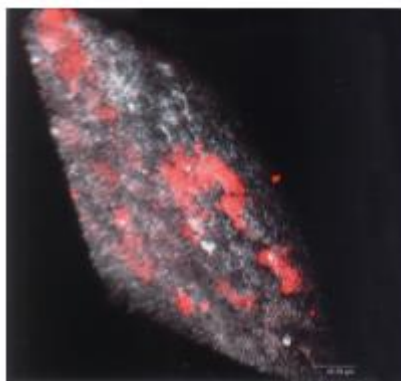
Barvení fermentovaného mléka probíhalo při teplotě 5 °C po dobu 1 h, aby mohlo dojít k dostatečné difúzi pigmentu. Bylo vyzkoušeno barvení s promícháním i bez promíchání indikátoru ve vzorku (viz obr. 7). Připravené analyty byly analyzovány CLM (Hassan et al., 2002).



Obr. 7: Distribuce EPS (vyznačeno zeleně) v rámci struktury fermentovaného mléka barveného konjugovaným aglutininem, úsečka = 10 μm . A – mléko fermentované *S. thermophilus* CHCC 3534 (táhlovitý) a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC 769 (netáhlovitý) a barvené bez promíchání indikátoru se vzorkem; B – mléko fermentované *S. thermophilus* CHCC 3534 a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC 769 a barvené s promícháním indikátoru; C – mléko fermentované EPS⁺ *Lactococcus lactis* CHCC 3367 a barvené bez promíchání indikátoru; D – mléko fermentované EPS⁺ *Lc. lactis* CHCC 3367 a barvené s promícháním indikátoru (Hassan et al., 2002).

Pro sledování EPS v sýru feta bylo přidáno barvivo na 3 mm tenké plátky sýra dále uchovávané při teplotě 5 °C po dobu 1 h. Kousky sýra byly následně propláchnuty syrovátkou pro odstranění přebytku barviva a pozorovány pomocí CLM, jak je zobrazeno na obrázku 8 (Hassan et al., 2002).

EPS v sýru feta byly pozorovány jako výrazné hmoty vyplňující póry v proteinové struktuře. Obdobné póry již byly objeveny Hassanem a kol. (1995) v jogurtu fermentovaném stejným kmenem, tedy *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534. Studií bylo prokázáno, že tyto póry se nacházejí v okolí bakteriálních buněk jako výsledek přítomnosti kapsulárních EPS.



Obr. 8: Distribuce EPS (vyznačeno červeně) v bílkovinné matrix (znázorněno bíle) v sýru feta barveném konkanavalinem A fermentovaném *Streptococcus thermophilus* 3855 (Hassan et al., 2002).

CLM umožnila u připravených vzorků vizualizaci plně hydratovaných EPS ve struktuře produktů. EPS a proteiny se zde vyskytovaly jako zřetelně odlišné entity, s přítomností EPS v pórech proteinové sítě. Ve větším množství byly EPS pozorovány v mléce fermentovaném táhlovitou kulturou *Lactococcus lactis* v porovnání s mlékem fermentovaným méně táhlovitou kulturou *Streptococcus thermophilus*. Zatímco předchozí výzkum prokázal, že neexistuje žádná přímá souvislost mezi množstvím produkovaných EPS a táhlovitostí ve spojení s druhem kultury (van Marle and Zoon, 1995). Výsledky této studie naznačují, že tento závěr nemusí být vždy platný. Mícháním barviva se vzorkem byla rozbita původní spojitá proteinová síť. Míchání však nezpůsobilo smíšení proteinů a EPS, ale spíše segregaci dvou komponent způsobujících shromažďování EPS v rozsáhlejších strukturách. Z toho vyplývá, že míchání podporuje vzájemnou interakci mezi EPS a mění původní strukturu matrice (Hassan et al., 2002).

Výskyt EPS ve fermentovaném mléku zjištěný pomocí CLM se lišil od výsledků SEM. SEM zobrazuje EPS v jogurtu ve struktuře proteinové sítě (Kalab et al., 1983; Schellhaass and Morris, 1985; Teggatz and Morris, 1990), kde se EPS jeví jako filamenty přidružené k bakteriálním buňkám a proteinové síti. Tento filamentový vzhled je pravděpodobně způsoben dehydratací EPS vyplývající z techniky přípravy vzorků (Kalab, 1993).

Závěrem lze říci, že konjugáty lektinů byly úspěšně použity jako barviva v kombinaci s CLM k pozorování bakteriálních EPS v plně hydratovaných mléčných výrobcích. Čím táhlovi-
tější kultura, tím větší množství EPS bylo pozorováno. Metodu lze s výhodou použít pro přímé pozorování vlivu EPS na texturu a reologii výrobků (Hassan et al., 2002).

3.2.3 Metody kvantitativní analýzy

Po kvalitativním rozboru lze přikročit k dalšímu kroku, a to k zjišťování množství analyzované látky. To lze provést různými metodami, a to např. vážkovými, odměrnými nebo fyzikálně-chemickými. Při vážkovém stanovení dochází k vyloučení sraženiny pomocí chemických reakcí. Sraženina je poté dokonalým promytím, vysušením nebo vyžháním převedena na sloučeninu konstantního složení a z její váhy je stechiometrickým výpočtem stanoveno množství analyzované látky. Při odměrných stanoveních je měřen objem činidla určité koncentrace. Tato metoda je mnohem rychlejší a v některých případech i přesnější, než u postupu vážkového. Fyzikálně-chemické analytické metody jsou nejmladším odvětvím analytické chemie a jsou dnes běžně používané ve vědeckých, provozních a kontrolních laboratořích. Stanovení bývají prováděna speciálními přístroji, většinou dost nákladnými, avšak s vysokou přesností a rychlostí (Voříšek et al., 1965). Mezi kvantitativní analytické metody pro stanovení EPS BMK patří infračervená spektroskopie, kolorimetrie, chromatografické metody a PCR metody (Hassan et al., 2002; Marcotte et al., 2007; Meisen et al., 2008; Van der Meulen et al., 2007).

3.2.3.1 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je jednou z nedestruktivních analytických metod, která poskytuje informaci o složení vlastního vzorku bez nutnosti jeho předúpravy. Získané hodnoty souvisí s pevností chemických vazeb, molekulovou geometrií a hmotností jader. Podstatou této analytické kvantitativní i kvalitativní metody je interakce infračerveného záření se studovanou hmotou. V případě, že je studovanou hmotou pohlcen foton, jedná se o absorpční infračervenou spektroskopii. Pokud je foton vyzářen, nazýváme tuto metodu infračervenou spektroskopií emisní. Infračervené záření je elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů $12\ 500$ až $20\ \text{cm}^{-1}$ a vlnových délek v rozsahu 800 až $0,5\ \text{mm}$. To znamená, že infračervené záření navazuje na záření viditelné a magnetické. (Brown, 1998; Wilson et al., 1980).

Fourierova transformační infračervená (FTIR) spektroskopie je v mikrobiologii úspěšně používána ke klasifikaci bakterií a kvasinek (Helm et al., 1991; Naumann et al., 1991; Sockalingum et al., 1998). S její pomocí bylo prokázáno, že změny v rámci infračerveného spektra bakterií se mohou odrážet v obsahu proteinů i EPS díky vibraci spojené s funkční skupinou charakteristickou danému druhu (Verhoef et al., 2005; Van der Mei et al., 1989). Z kvantitativního hlediska FTIR spektroskopie je již užívána v potravinářském průmyslu ke stanovení laktózy, proteinů a tuku v mléce (Lefier et al., 1996; Luinge et al., 1993).

Autoři Marcotte a kol. (2007) ve své studii porovnali analýzu bakteriálních EPS metodou infračervené spektroskopie s metodou kolorimetrickou. Skupiny cukrů syntetizovaných bakteriálními koloniemi se mohou v rámci kmenů velmi lišit. Co se týče metody infračervené spektroskopie, závislost kvantifikace polysacharidů na jejich povaze přímo souvisí s jejich absorbcí v daném prostředí. K optimalizaci obou metod vytvořili reprezentativní modely bakteriálních vzorků. Jednalo se o ternární směsi skládající se z DNA, hovězího sérového albuminu a polysacharidů - sacharózy, *D*-laktózy, alginátu, mannanu a xantanové gumy. Byly použity různé typy sacharidů z důvodu různé citlivosti, o koncentraci 0,04 - 0,42 % hm. Každá směs obsahovala vždy jen jeden nebo dva z výše uvedených polysacharidů. Tyto ternární směsi byly připraveny tak, aby byla koncentrace různých chemikálií přibližně 10 mg.ml⁻¹ a pokaždé byly před analýzou adekvátně zředěny (Marcotte et al., 2007).

Ve studii autorů Marcotte a kol. (2007) bylo použito 5 kmenů bakterií, 1 kmen EPS⁺ *Pseudomonas aeruginosa*, který produkuje sliz, 2 kmeny *Pseudomonas aeruginosa* EPS⁺ neprodukující sliz, *Streptococcus mutans* a *Staphylococcus epidermis*. Kmeny byly kultivovány nejprve v příslušných bujónech, v případě *P. aeruginosa* a *S. epidermis* bylo živné médium tvořeno mozko-srdečním bujónem, zatímco kmen *S. mutans* byl pěstován na peptonu obsahujícím kvasnicový extrakt a 0,5 % glukózy. Po celonočním růstu při 37 °C byly kultury přeneseny na ovčí krevní agar, s výjimkou *S. mutans* kultivovaného na TYE agaru a *P. aeruginosa* kultivovaného na R2A agaru po dobu 20 h. Poté bylo zhruba 100 mg vzorku suspendováno v 1 ml ultračisté vody. Nakonec byla jejich vodná suspenze přenesena na zinkovo-selenidové krystaly, aby byla charakterizována vhodnost této metody pro kvantifikaci produkce EPS bakteriálních biofilmů. Byly použity biofilmy produkované *S. mutans* a *S. epidermis*. Biofilmy byly pěstovány na zmíněných krystalech v průtokové komoře vytemperované na 36 °C po dobu 20 h. Živným médiem pro *S. mutans* byl TYE agar, pro *S. epidermis* BHI agar. Před vlastní analýzou byly vzorky promyty sodnofosfátovým pufrem kvůli odstranění sacharidů a suspendovány ve vodě na požadovanou koncentraci (Marcotte et al., 2007).

Pro spektroskopické měření v IR oblasti bylo 30 µl vzorku kápnuto doprostřed laboratorního sklíčka z CaF₂ nebo BaF₂ a sušeno ve vakuu po dobu 20 minut. Poté proběhlo měření v celé IR oblasti a vyhodnocení. Mez citlivosti u kalibrovaných vzorků byla 17 µg.ml⁻¹ (Marcotte et al., 2007). Výsledky byly porovnány s kolorimetrií, jež je popsána v kap. 3.2.3.2.

Hranice citlivosti obou porovnávaných metod odpovídala koncentraci 17 µg.ml⁻¹ kalibračních standardů. Výsledky FTIR spektroskopie korelují s výsledky kolorimetrie. Metoda FTIR spektroskopie byla pro kvantifikaci obsahu sacharidů přesnější než metoda kolorimetrická. Hod-

noty získané infračervenou spektroskopií se pohybovaly v průměru kolem čísla $4,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou 1,3 odpovídající relativní odchylce 31 %, zatímco při kolorimetrickém testu byl průměr $3,9 \text{ mg.ml}^{-1}$ se směrodatnou odchylkou 2,1 odpovídající relativní odchylce 54 % (Marcotte et al., 2007).

V porovnání s kolorimetrií je tato metoda méně citlivá na povahu cukrů, ale na druhou stranu je rychlejší a není potřeba tolika vzorků (Marcotte et al., 2007).

3.2.3.2 Kolorimetrie (spektrofotometrické metody)

Kolorimetrie je metoda založená na porovnávání barevnosti vzorků se standardem, přičemž je využíváno skutečnosti, že při shodné absorpci světla porovnávaných roztoků je součin koncentrace barevné složky a tloušťky vrstvy roztoku stejný. Pro porovnávání je možno použít také sadu standardních roztoků s odstupňovanou koncentrací analyzované barevné složky, které jsou v kyvetách. Kolorimetrie je nejstarší způsob využití absorpce světla pro analytické účely (Garaj et al., 1987).

V současné době je kvantifikace celkového počtu EPS prováděna především pomocí kolorimetrické metody navrhnuté Dubois a kol. (1956). Tento test pracuje na bázi redukce cukerných skupin pomocí fenolu a kyseliny sírové a měření absorbance při 490 nm odpovídající redukováním cukrům. Před vlastním měřením je nutno získat kalibrační křivku standardů, jež je důležitá pro výpočet koncentrace sacharidů. Tato metoda je přesná pro daný typ cukru, neboť absorbance jednotlivých cukrů je odlišná. To představuje jisté omezení, v důsledku něž je metoda méně vhodná pro testování neznámých sacharidů či jejich směsí, což je běžná situace v případě EPS BMK. Pokroky v kolorimetrii vedly k redukci nepřesností, jakou je například již zmíněná závislost na typu sacharidu (Taylor, 1995). Jenže tyto úpravy zahrnují dodatečné kroky a mají jen omezenou úspěšnost, pokud je zkoumán komplex polysacharidů. Navíc bylo také dokázáno, že kolorimetrická reakce může být inhibována v případě spojení cukrů s proteiny (Allison et al., 1999; Ebel et al., 2000), což vede k dalším nepřesnostem. Vzhledem k tomu, že množství EPS musí být normalizováno s množstvím biomasy, je třeba metodu obvykle spojit s dalšími metodami, mezi něž patří např. přímé počítání kolonie tvořících jednotek (CFU) za pomoci průtokové cytometrie, nebo nepřímá analýza počtu bakterií a množství proteinů (Van Dilla et al., 1983; Zubkov et al., 1999).

Postup přípravy vzorků pro tuto metodu, jež byla použita v práci Marcotte a kol. (2007), byl shodný s přípravou pro FTIR spektroskopii popsanou v kapitole 4.1.1.3. Po přípravě vzorků bylo $100 \mu\text{l}$ každého z nich vloženo do zkumavky z borosilikátového skla a uloženo.

V modelových vzorcích to znamenalo 8 - 420 μl EPS na zkumavku. Dále bylo do každé zkumavky přidáno 100 μl roztoku fenolu (5% roztok v ultračisté vodě) a vzorky byly centrifugovány. Poté byla rychle přidána koncentrovaná kyselina sírová v množství 500 μl . V následujícím kroku byly zkumavky chlazeny v lázni na teplotu 25 °C po dobu 15 min. Následně bylo provedeno opětovné odstředění a přenesení uložených alikvot do jamek 96-jamkové destičky. Absorbance byla měřena při 490 nm za použití spektrofotometru Dynatech MR5000. Pro každý vzorek byla provedena 3 paralelní měření. Absorbance nulového roztoku (100 μl ultračisté vody s reaktanty) byla odečtena od absorbancí vzorků. Veškeré vzniklé chyby odpovídaly standardní odchylce (Marcotte et al., 2007).

Ve srovnání s metodou spektroskopickou byla kolorimetrie citlivější na povahu cukrů, avšak časově a materiálově (množství vzorků) náročnější. Přesnost byla u obou metod podobná (přesnější bylo stanovení FTIR spektroskopii) a byla potvrzena jejich vzájemná korelace. Z hlediska porovnávání G^+ a G^- bakterií by byla potřeba ještě další kalibrace.

V literatuře již bylo popsáno několik dalších typů spektrofotometrických (kolorimetrických) metod analýzy EPS BMK. Někteří autoři používají kyselinu trichloroctovou ke koagulaci proteinů a dialýzu k finálnímu čištění roztoku EPS od jednoduchých cukrů (Rimada and Abraham, 2003). Další možností je precipitace proteinů pomocí ethanolu a destilované vody (Rimada and Abraham, 2003).

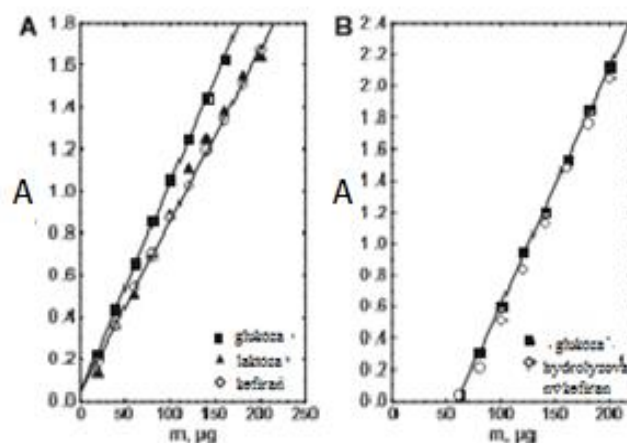
Kvantitativní analýza přečištěných EPS byla ve studii autora Southgatea (1991) provedena pomocí kolorimetrie, již předcházela příprava vzorků reakcí s anthronem (Southgate, 1991), nebo fenolem a kyselinou sírovou (Dubois et al., 1956, Cheirsilp et al., 2001, 2003; Frengova et al., 2002; Piermaria et al., 2008; Rimada and Abraham, 2001, 2003; Taniguchi et al., 2001). Výzkum autora Enikeeva (2012) byl zaměřen na získání rychlé a jednoduché metody pro stanovení EPS ve fermentovaných mléčných výrobcích a jako vzorky byla použita biomasa keřirových zrn z mlékárny Krasny Yar, (obl. Samarskaya, Ruská federace) nebo fermentovaná syrovátka. Definované množství keřirových zrn (50 ml) bylo přidáno do vroucí vody v poměru 1:10 na dobu 30 min za stálého míchání. Vzniklá směs byla odstředěna (10 000 g, 20 min, 20 °C) a EPS v supernatantu vysráženy přidáním 96% potravinářského ethanolu (srážení probíhalo při -20 °C přes noc). Vzniklá sraženina byla odstředěna (10 000 g, 20 min, 20 °C), rozpuštěna v horké vodě a opět vysrážena 96% ethanolem za stejných podmínek. Celý proces srážení byl opakován celkem třikrát (Enikeev, 2012; Rimada and Abraham, 2001).

Následovala hydrolýza EPS 2 M kyselinou sírovou a neutralizace hydrolyzátu 20% hydroxidem sodným. Množství EPS bylo změřeno kolorimetrickou metodou pomocí redukujících

cukrů a vyjádřeno jako ekvivalent glukózy (Fairbridge et al., 1951). Pro porovnání byla použita spektrofotometrická metoda využívající fenol-sírovou kyselinu (Dubois et al., 1956; Enikeev, 2012). Výsledky spektrofotometrie zobrazuje obrázek 12. Metoda patří jedné z nejdéle používaných a vyžaduje dlouhou a složitou předúpravu vzorků a také kalibraci.

Spektrofotometrie poskytuje údaje o interakci fotonů nejrůznějších energií s hmotou a umožňuje z těchto údajů získávat závěry o složení látek i o jejich kvantitativním zastoupení dané směsi. Měření je založeno na zkoumání absorpce záření při určitých vlnových délkách. Chemické výzkumy využívají záření prakticky všech vlnových délek počínaje zářením gama a paprsky X přes záření viditelné, ultrafialové, infračervené a mikrovlnné až po rádiové vlny (Kalous, 1975).

V případě použití fenol-sírové kyseliny při analýze EPS z keřirových zrn, (Enikeev, 2012), je možno dosáhnout spolehlivých výsledků při použití laktózy jako kalibračního standardu. Důvodem je, že keřiran, což je exopolysacharid keřirových zrn, je glukogalaktan s poměrem glukózy a galaktózy přibližně 1:1 (Maeda et al., 2004; Micheli et al., 1999; Piermaria et al., 2008). Pokud se však složení EPS neshoduje se standardem (obr. 9A), výsledek není platný. Při kalibraci na redukují cukry je tento nedostatek odstraněn (obr. 9B). Pak může být metoda využita při analýze fermentovaných mléčných produktů bez ohledu na typ startéru, protože EPS⁺ BMK, jež jsou využívány k přípravě kysaných mléčných výrobků, syntetizují převážně EPS složené z glukózy, fruktózy, galaktózy, rhamnózy, xylózy a mannózy (Ariga et al., 1992; Cerning et al., 1994), tedy redukujících cukrů. Avšak z důvodu rozdílů v rámci molekulární hmotnosti některých monosacharidů s glukózou jakožto standardem může dojít ke zkreslení výsledků (Enikeev, 2012).



Obr. 9: Výsledky kvantitativní analýzy EPS BMK spektrofotometrickou metodou.

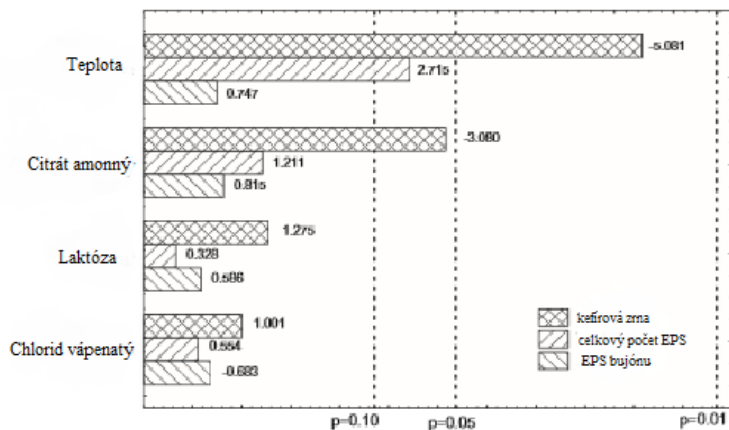
A – kalibrační křivka laktózy fenol-sírovou metodou. B – kalibrační křivka glukózy metodou redukujících cukrů (Enikeev, 2012).

Výsledky studie jsou shrnuty v tabulce 2. Průměrné množství EPS ve výrobcích bylo 100 - 150 mg.l⁻¹. U syrovátky fermentované keřirovou kulturou, bylo průměrné množství 57,2 - 103,4 mg.l⁻¹ (Rimada and Abraham, 2001). Nejvyšší obsah EPS byl zjištěn v keřiru „Bio Balance“ obohaceném bifidobakteriemi (Enikeev, 2012).

Tabulka 2: Množství EPS v Ruských keřirových výrobcích (Enikeev, 2012).

Název výrobku	Množství EPS [mg.l ⁻¹]
Doctor Brand	107,5 ± 16,1
Activia	75,3 ± 13,9
Danon	113,1 ± 9,9
Bio Balance	202,5 ± 19,4
Prostokvashino	50,9 ± 8,1
Veselyi molochnik	142,8 ± 14,4
Domik v derevne	81,8 ± 13,5

Pro určení faktorů (teplota, citrát amonný, laktóza a chlorid vápenatý) ovlivňujících biomasu keřirových zrn a koncentraci EPS v médiu byla keřirová zrna kultivována v pasterovaném odstředěném mléce. Výsledky jsou shrnuty na obr. 10. Optimální teplotou pro produkci EPS keřirovými zrny bylo stanoveno 43 °C (Rimada and Abraham, 2001), zatímco optimální teplota pro EPS *Lactobacillus keřiranofaciencie* (tvořící majoritu keřirových zrn) 30 °C (Cheirsilp et al., 2001, 2003; Taniguchi et al., 2001). Vzdělání teploty na 40 °C tak vedl k redukci keřirových zrn biomasy a zvýšení celkového počtu EPS ve shodě s autory Rimadou a Abrahamem (2001). Dalším důležitým faktorem byl zdroj uhlíku, anorganického dusíku a obsah vápníku. Je známo, že některé mikroorganismy mohou asimilovat anorganický dusík na aminokyseliny (Krus et al., 1988). Zaznamenaná negativní korelace růstových podmínek pro produkci EPS s hmotností keřirových zrn je jen okrajově významná.



Obr. 10: Působení různých faktorů na biomasu keřirových zrn a celkový počet EPS (Enikeev, 2012).

Pozitivní vliv přidavku chloridu vápenatého jako zdroje vápníku byl též významný pouze okrajově, ale s přihlédnutím k výsledkům získaným autory Yokoi a Watanabe (1992), by mohl být pozitivní vliv tohoto aditiva potvrzen (Yokoi and Watanabe, 1992; Enikeev, 2012).

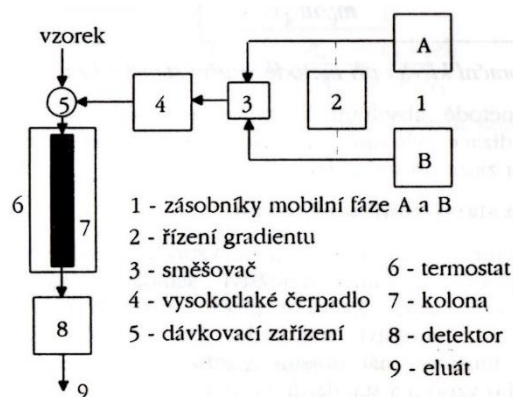
3.2.3.3 Chromatografické metody

Chromatografie je separační metoda, při které dochází ke vzájemnému oddělení složek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi 2 fáze. První z nich je nepohyblivá a je nazývána stacionární. Přes ni se pohybuje druhá nazývaná mobilní. Díky pohybu mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku, které lnou ochotněji ke stacionární fázi, se při pohybu zdržují více než ostatní, jež ke stacionární fázi mají afinitu nižší. Takto se postupně složky od sebe separují. Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a nazpět. Doba, po kterou průměrná molekula dané složky setrvá na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem a určuje pořadí, v jakém složka eluuje, neboli vychází z kolony. Čím silnější interakce, tím později složka eluuje, má tedy větší retenční čas. Z kolony vycházejí složky odděleně a mezi nimi je zóna čisté mobilní fáze (Klouda et al., 1996; Churáček et al., 1990).

Podle povahy mobilní fáze bývají chromatografické metody děleny na kapalinové, kde je mobilní fází kapalina, a na plynové, kde je mobilní fází plyn (Klouda et al., 1996). Fáze stacionární se v chromatografii může vyskutowat v rozdílných formách. Někdy ve formě částic tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, jindy jako tenká vrstvička kapaliny nanosená

na tuhých částicích nebo film kapaliny na vnitřní straně kapiláry. Proto se obecně používá pojem sorbent pro jakoukoli formu stacionární fáze (Churáček et al., 1990).

Kolona je část chromatografu (schéma přístroje je znázorněno na obr. 11), ve které je umístěna stacionární fáze, a zároveň místo, kde nastává separace složek. Kolony o menším vnitřním průměru poskytují vyšší účinnost separace, kolony většího průměru mají naopak vyšší kapacitu a jsou tedy schopny separovat větší množství vzorku (Klouda et al., 1996).



Obr. 11: Schéma kapalinového chromatografu (Klouda et al., 1996).

Pro všechny metody kapalinové chromatografie je společné, že mobilní fází tvoří kapalina. Stacionární fáze představuje sorbent, který může být umístěn plošně (ve vrstvě) či v uzavřené trubici (koloně, sloupci). V důsledku toho byly vyvinuty i názvy jednotlivých metod kapalinové chromatografie. V plošném uspořádání se jedná o metody papírové a tenkovrstvé chromatografie (TLC), v kolonové chromatografii mluvíme o dnes již klasické kapalinové (LC) a gelové permeační chromatografii (GPC), využívané převážně k preparativním účelům, k čištění a izolaci látek, a o vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), k jejímuž rozvoji došlo v posledních letech (Churáček et al., 1990).

Pro chromatografickou analýzu EPS se nejčastěji používá GPC a HPLC. Stále se rozrůstající znalosti z oblasti genetiky produkce EPS vedly v nedávné době k vývoji chromatografických metod jejich kvalitativní i kvantitativní analýzy na molekulární úrovni, jež mohou rozlišit homopolysacharidy i heteropolysacharidy (Churáček et al., 1990).

3.2.3.3.1 Gelová permeační chromatografie

GPC je speciálním druhem kolonové kapalinové chromatografie a slouží především ke stanovení molekulových hmotností a k analýze směsí oligomerních sloučenin. Na rozdíl

od absorpční či rozdělovací chromatografie je separace závislá jen na velikosti molekul analyzovaných látek a téměř vůbec nezávisí na jejich chemické povaze. Chemické vlastnosti určují pouze systém, v němž bude separace prováděna. Jedná se o volbu hydrofilního či hydrofobního gelu a s tím související volbu elučního činidla (Churáček et al., 1990).

Pomocí této metody je možné separovat jakékoliv molekuly, které se liší svými rozměry, pokud se dobře rozpouštějí v určeném rozpouštědle. Moderní GPC umožňuje separaci celé řady látek od nízkomolekulárních až po vysokomolekulární, jejichž relativní molekulová hmotnost je v rozmezí 10^2 až 10^7 , bez ohledu na jejich velikost (Churáček et al., 1990).

Pořadí eluce při GPC je zcela odlišné od pořadí v HPLC v tom, že největší molekuly opouštějí sloupec nejdříve a potom odcházejí z kolony látky s menší molekulovou hmotností. Nejmenší molekuly musí vykonat mnohem delší cestu při průchodu kolonou, proto mají nejvyšší hodnoty elučního času (Churáček et al., 1990).

Churáček a kol. (1990) dále popisuje GPC jako metodu, která dělí látky na základě tzv. síťového efektu. Síťový efekt lze popsat tak, že částice sorbentu obsahují póry o známé velikosti a tyto póry jsou zaplněny tzv. stacionární mobilní fází, tj. mobilní fází, která se nepohybuje. V průběhu dělení vzorku využívají jeho nejmenší molekuly největší část stacionární mobilní fáze, větší molekuly využívají jen část pórů a všechny molekuly, jejichž průměr je větší než vstupní otvor pórů, vycházejí z kolony s elučním časem odpovídajícím průtoku mobilní fáze mezi zrny sorbentu. Poslední uvedený případ bývá označován jako totální exkluze. Rozhodujícím parametrem pro separaci složek pomocí GPC je hydrodynamický průměr molekuly, což je průměr koule, kterou opiše molekula při volné rotaci v prostoru (Churáček et al., 1990).

Požadavky na vlastnosti stacionárních fází pro GPC jsou velmi náročné. Musí být vůči stanovovaným látkám i mobilní fázi inertní, a to i při použití kyselých i bazických soustav v širším rozsahu pH. Gel musí být dále odolný i při zvýšené pracovní teplotě, nesmí se během analýzy rozkládat a uvolňovat produkty rozkladu. Mezi nejčastěji používané stacionární fáze patří dextranové a agarózové gely (Churáček et al., 1990).

Metoda GPC byla využita ke kvalitativní analýze EPS např. ve studii provedené Meulenem a kol. (2007). Bylo použito 174 kmenů BMK, jež byly izolovány na MRS agaru o pH 5,4. K zachování čerstvých kultur byly kmeny nejprve pěstovány v odpovídajícím živném médiu. Izoláty z obilných výrobků byly kultivovány při teplotě 30 °C na MRS agaru obsahujícím 10 g.l⁻¹ maltózy, 10 g.l⁻¹ fruktózy, 50 g.l⁻¹ sacharózy, zatímco izoláty mléčných výrobků byly kultivovány při teplotě 37 °C na MRS agaru obsahujícím 50 g.l⁻¹ sacharózy jako jediný zdroj energie. Po 12 hodinách růstu byly odstředěním odstraněny buňky a supernatant byl dále použit

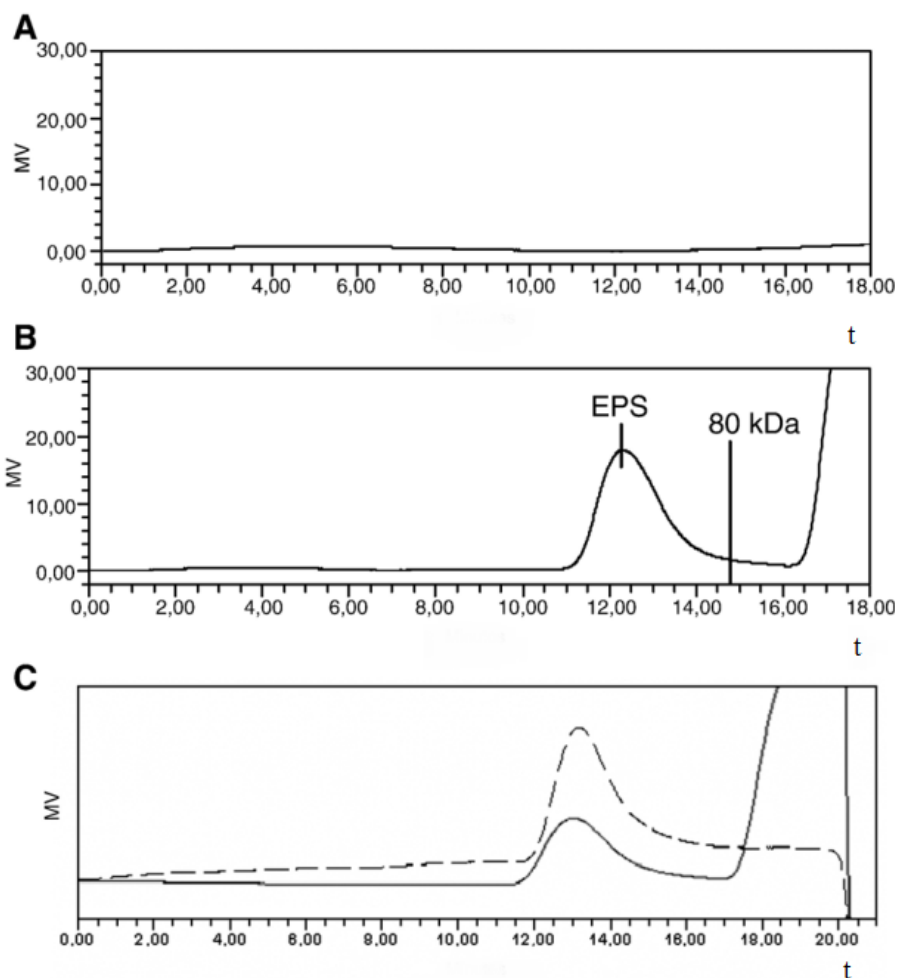
pro screening produkce EPS. Utváření kapsulárních EPS bylo vyhodnoceno pomocí techniky negativního zbarvení indickým inkoustem na buňkách kmenů BMK (Meulen et al., 2007).

Screening EPS pomocí GPC byl proveden s využitím Watersova chromatografu vyplněného ultrahydrogelem vytemperovaným na teplotu 35 °C s refraktometrickou detekcí. Jako mobilní fáze bylo použito 0,1 M roztoku NaNO₃ za průtoku 0,6 ml.l⁻¹. Ze vzorků byly nejprve odstraněny proteiny vysrážením Carrezovým činidlem a odstředěny (16 060 g, 15 min). K supernatantu byly dodány 3 ml destilované vody a bylo provedeno opětovné odstředění (16 060 g, 15 min) následované filtrací vzorku přes PCD mikrofiltry o porozitě 0,22 mm. V některých vzorcích bylo množství EPS tak vysoké, že ucpávalo filtr. V tomto případě byly naředěny 3 ml ultračisté vody.

Pro potvrzení výsledků získaných pomocí GPC screeningu byly pozitivní kmeny izolovány srážením acetonem. K rozlišení homopolysacharidů a heteropolysacharidů byla použita monomerní analýza. Ta odhalila, že 9 z 10 EPS byly glukany produkované v množství odpovídající 0,8 až 17 g.l⁻¹.

Z celkových 174 izolátů bylo 10 z nich shledáno EPS⁺. Celkem 27 ze 174 kmenů, k nimž patřily 4 z 10 EPS⁺ kmenů, produkovalo kapsulární polysacharidy. EPS⁻ kmeny nevykazovaly v GPC chromatogramech žádný vrchol, čímž bylo potvrzeno, že přečištění vzorků pomocí ultrafiltrace bylo dostatečné. Naopak pro EPS⁺ kmeny lze v chromatogramech vrchol pozorovat, jak je znázorněno na obrázku 12. Ze všech kmenů, které byly v průběhu GPC screeningu shledány pozitivními, mohou být izolovány pouze EPS, což potvrzuje účinnost této metody (Van der Meulen et al., 2007).

Aplikovaná GPC metoda screeningu umožnila detekci EPS o koncentraci až 20 mg.l⁻¹ za méně než 2 hodiny, což ji dělá vhodnou metodou pro rychlý screening. Technika GPC screeningu také umožnila okamžitý odhad molekulární hmotnosti EPS. Tato informace může hrát důležitou roli při výběru kmenů produkujících EPS, protože kmeny s vysokou molekulární hmotností EPS vykazují dobré výsledky při zvyšování viskozity mléčných produktů (Jolly et al., 2002; Tuinier et al., 2001).

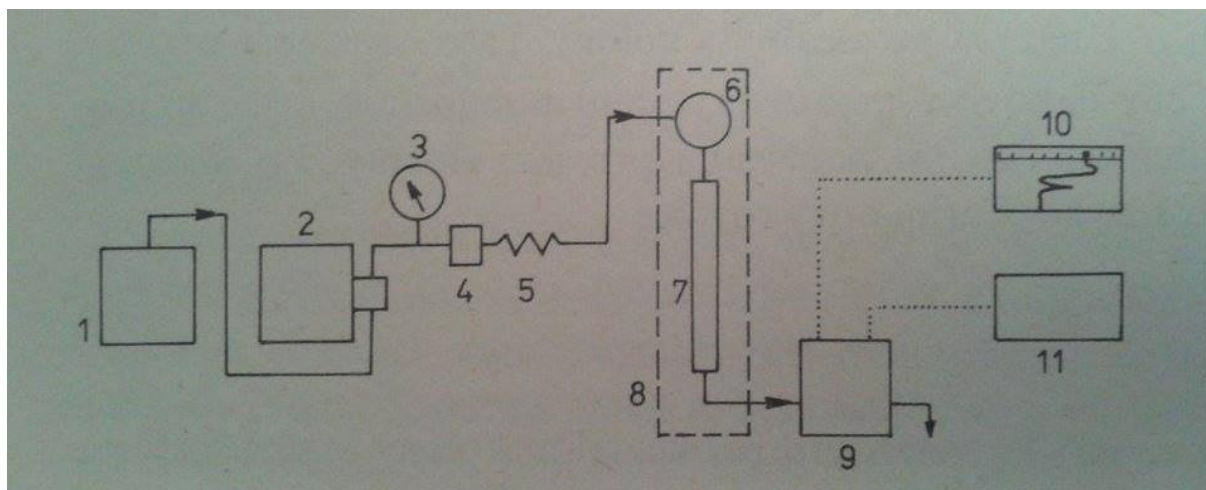


Obr. 12: Příklad chromatogramů analýzy EPS pomocí gelové permeační chromatografie. A - EPS⁻ *Lactobacillus plantarum*, B - EPS⁺ *Leuconostoc citreum*, vertikální přímka odpovídá elučnímu času standardu dextranu o molekulové hmotnosti 80 kDa, C - EPS⁺ *Leuc. citreum*, přerušovaná čára korespondující s chromatogramem odpovídá izolovaným a přečištěným EPS; plná čára koresponduje s centrifugátem (Van der Meulen et al., 2007).

3.2.3.3.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Moderní kapalinový chromatograf se značně liší od poměrně jednoduchého zařízení používaného v klasické kapalinové kolonové chromatografii. Jak je zobrazeno ve schématu přístroje v základním provedení na obr. 13, kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze (1 až 5), dávkování vzorku (6), separaci látek (7) a jejich detekci (9), záznam (10) a zpracování dat (11). Mobilní fáze z vhodného zásobníku (1) je dávkována vysokotlakým čerpadlem (2) vybaveným čidem k měření tlaku (3) přes filtr tuhých částic (4)

a průtočný tlumič pulsů (5) a přes zařízení pro dávkování vzorků (6) do chromatografické kolony (7) a detektoru (9). Za detektor je eventuálně možno zařadit jímač frakcí (Churáček et al., 1990).



Obr. 13: Blokové schéma jednoduchého kapalinového chromatografu. 1 – zásobník mobilní fáze, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – čidlo pro měření pracovního tlaku, 4 – filtr, 5 – průtočný tlumič pulsů, 6 – zařízení pro dávkování vzorku, 7 – chromatografická kolona, 8 – termostatová skříň, 9 – detektor, 10 – zapisovač, 11 – zařízení pro zpracování dat, např. integrátor (Churáček et al., 1990).

HPLC chromatografie byla použita pro analýzu EPS BMK např. v práci Meisena a kol. (2008). Aparatura použitá pro HPLC byla tvořena z kapalinového chromatografu WellChrom od Knauer (Berlín, Německo) obsahující detektor indexu lomu (RI). Dvě analytické kolony používané pro analýzu, Hypercarb s PGC stacionární o šířce 5 μm a Eurokat s olovnatou formou kationtů (opatřena předkolonou stejné stacionární fáze) o šířce 10 μm . Kolony byly v průběhu aplikace vytemperovány na konstantní teplotu pomocí sloupcového termostatu Jetstream Plus Peltier v provozu v rozsahu od 15 do 85 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$).

Pro všechny experimenty byla použita třikrát destilovaná voda. Použité mobilní fáze byly 0,1% trifluoroctová kyselina pro kolonu Hypercarb a voda pro kolonu Eurokat. Jedno- i více-složkové vodní standardní roztoky byly připraveny z monosacharidů (glukóza, galaktóza, manóza) a oligosacharidů (sacharóza, maltóza) ve vodě o koncentraci v rozmezí od 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ do 5,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztoky vybraných monosacharidů byly připraveny ve směsi methanol voda v poměru 95:5. Detekční limit metody dosahoval při použití obou kolon hodnoty $\leq 0,042$ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ s opakovatelností 0,45 - 2,10 %.

Bakteriální alginát byl očištěn od buněk EPS⁺ kmene *Pseudomonas aeruginosa* SG81, dle postupu popsaného Wingenderem a kol. (2001). Bylo prokázáno, že použití olovené kolony (Eurokat Pb) za použití vody jako mobilní fáze společně s RI detektorem umožňuje oddělení neutrálních monosacharidů, jako jsou aldopentózy, aldohexózy, deoxymonosacharidy a *N*-acetylaminohexóz, zatímco PGC kolona (Hypercarb) byla zjištěna jako nevhodná pro tuto separaci. Zkoumání vlivu matrixu různých sloučenin ukázalo, že chromatografické separace za použití Eurokat Pb kolony v přítomnosti monosacharidů a SO₄²⁻ a Cl⁻ nejsou možné. Uplatnění PGC kolony Hypercarb za použití trifluoroctové kyseliny jakožto mobilní fáze s RI detektorem bylo naopak úspěšné pro analýzu uronových kyselin a jim příbuzných γ -laktónů. Byla prokázána závislost disociace kyseliny uronové a octové na pH. Byla také stanovena rovnováha uronových kyselin glukózy a manózy a jejich korespondujících γ -laktonech ve vodném roztoku na pH a koncentraci složek. Pomocí způsobu HPLC, který byl popsán, byl vytvořen užitečný základ pro charakterizaci alginátů a dalších extracelulárních polysacharidů v mikrobiálních biofilmech. Práce Meisena a kol. (2008) prokázala, že kvantifikace *L*-guluronové kyseliny je možné za použití kalibračního standardu manózy namísto standardu *L*-guluronové kyseliny (Meisen et al., 2008).

3.2.3.4 PCR metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Výhodou této metody je především to, že je díky ní umožněno získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, což je základní molekulární proces všech živých organismů. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, jež se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně (Šmarda et al., 2005).

PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají 3 kroky, během nichž probíhají 3 odlišné děje s různými nároky na teplotu. Prvním z nich je denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C), dalším krokem je připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30 – 65 °C) a posledním je syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65 – 75 °C). Výslednými produkty PCR jsou amplikony – úseky DNA, jejichž přítomnost je v reakční směsi průkazná stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém

nebo polyakrylamidovém gelu, případně kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (Šmarda et al., 2005).

PCR bylo pro analýzu EPS BMK využito například ve studii Van der Meulena a kol. (2007). PCR byla provedena s použitím různých primerů cílených na 5 genů (zobrazených v tabulce 3) kódujících produkci HoPS i HePS na 174 kmenech BMK, jež jsou uvedeny v tabulce 4. BMK byly izolovány z belgických a rumunských mléčných a obilných produktů zahrnujících syrové mléko (23 kmenů), fermentované mléko (14 kmenů), smetanu ke šlehání (47 kmenů), sýry (5 kmenů) a syrové těsto (85 kmenů). Všechny BMK byly izolovány na MRS agaru (Messens et al., 2002). Byla provedena PCR amplifikace celkem pěti párů primerů. Jako kontroly byly použity následující kmeny: *Streptococcus thermophilus* ST111, LY03 (*epsA* geny a geny podkladové glykosyltransferázy), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11.2 (*epsB* gen), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranum* LMG 7939 (geny glukansacharózy) a *Lactobacillus sanfranciscensis* 30 (geny fruktansacharózy). Produkty amplifikace, tedy PCR amplikony byly pozorovány za pomoci gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu (Gevers et al., 2001; Van der Meulen et al., 2007).

Tabulka 3: Přehled 5 párů primerů využitých ke screeningu EPS (Van der Meulen et al., 2007).

Sekvence (orientace 5'-3')	Geny	Zdroje
F: GAYAAAYWSIAAYCCIRYIGTIC	Glukansacharóza	Kralj a kol. (2003)
R: ADRTCICCRTARTAI AVIYKIG		
F: GAYGTITGGGAYWSITGGC	Fruktansacharóza	Tieking a kol. (2003)
R: TCITYYTCRTCISWIRMCAT		
F: TAGTGACAACGGTTGTACTG	<i>EpsA</i>	Low a kol. (1998)
R: GATCATTATGGACTGTCAC		
F: CGTACGATTCGTACGACCAT	<i>EpsB</i>	Deveau a Moineau (2003)
R: TGACCAGTGACACTTGAAGC		
F: TCATTTTATTCGTAAAACCTCAATTGAYGARYTNCC	Podkladová glyko- syltransferáza	Provencher a kol. (2003)
R: AATATTATTACGACCTSWNAYYTGCCA		

F: přímý směr, R: reverzní směr

Tabulka 4: Přehled izolátů BMK (Van der Meulen et al., 2007).

Bakteriální kmen	Počet izolátů
<i>Enterococcus durans</i>	10
<i>Enterococcus faecialis</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Enterococcus saccharominimus</i>	2
<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	25
<i>Lactobacillus curvatus</i>	4
<i>Lactobacillus farciminis/mindensis</i>	3
<i>Lactobacillus helveticus</i>	4
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	28
<i>Lactobacillus sakei</i>	5
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	10
<i>Lactobacillus zymae</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i>	40
<i>Lactococcus garviae</i>	1
<i>Leuconostoc citreum</i>	7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	7
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	6
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1
<i>Weissella confusa/cibaria</i>	1

Bylo zjištěno, že 29 kmenů BMK ze 174 izolátů obsahuje v DNA geny kódující glukans-acharózu nebo fruktansacharózu, jež jsou zodpovědné za syntézu HoPS. U 75 kmenů byla dále prokázána v DNA přítomnost jednoho nebo více genů kódujících enzymy účastnící se biosyntézy HePS (Van der Meulen et al., 2007).

Bohužel, analýzy izolátů neodhalily žádné specifické vztahy mezi typem a původem kmenů, přítomností či nepřítomností syntézy HoPS a HePS, ani mezi přítomností či nepřítomností genů pro produkci EPS (Van der Meulen et al., 2007).

Byla prokázána přesnost párů primerů zaměřených na správný gen v rámci několika druhů BMK, dokonce i u zástupců, u kterých to nebylo předpokládáno. Byly též rozpoznány kmeny ovládané geny spojené s biosyntézou HoPS i HePS. Bakteriální kmeny schopné produkovat 2 a více typů EPS (jednoho druhu, nebo i kombinace HoPS a HePS) jsou velmi zajímavé z komerčního hlediska, obzvlášť pokud působí zároveň na kvalitu potravinářského produktu i mají pozitivní účinky na lidské zdraví (Van der Meulen et al., 2007).

Během této studie bylo navíc zjištěno, že genetický screening může vytvářet také falešně pozitivní výsledky, jež mohou být rozděleny do dvou skupin. První zahrnuje kmeny, které generují pozitivní PCR signál, ale sekvence fragmentu DNA nekoresponduje s cíleným genem. Druhá skupina nepravých pozitivů obsahuje mikroorganismy, jež mají ve struktuře DNA geny pro produkci EPS, ale neprodukují je. Bývají označovány jako tzv. „bezvýrazné“ kmeny. Přestože v popisované studii se moc falešných pozitivů neobjevovalo, metoda genetického screeningu by měla být vždy doprovázena ještě další metodou, která odlišuje kmeny doopravdy produkující EPS od ostatních, např. GPC (Low et al., 1998; Meulen et al., 2007).

Genetický screening může být užitečným nástrojem k prvotnímu výběru mezi velkým množstvím mikroorganismů (BMK) (Van der Meulen et al., 2007).

Aplikovaná GPC metoda screeningu umožnila detekci EPS o koncentraci až 20 mg.l⁻¹ za méně než 2 hodiny, což ji dělá vhodnou metodou pro rychlý screening. Technika GPC screeningu také umožnila okamžitý odhad molekulární hmotnosti EPS. Tato informace může hrát důležitou roli při výběru kmenů produkujících EPS, protože kmeny s vysokou molekulární hmotností EPS vykazují dobré výsledky při zvyšování viskozity mléčných produktů (Tuinier et al., 2001; Jolly et al., 2002).

3.2.3.5 Gravimetrie

Principem gravimetrie je vysrážení přečištěných EPS pomocí etanolu či acetonu se stanovením jejich množství gravimetrickou koncovkou. Metoda je používána zřídka, neboť je poměrně pracná a její výsledky jsou ovlivněny účinností izolace EPS od interferujících polysacharidů živného média. Je proto vhodné ke kultivaci mikroorganismů používat polodefinovaná média, jež jsou prostá těchto interferujících sloučenin (Paulo et al., 2012).

4 ZÁVĚR

Ke stanovení exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení bývá využíváno jak kvalitativních, tak kvantitativních analytických metod. Mezi metody kvalitativní analýzy bývají řazeny metody plotnové, viskozimetrické, chromatografické (jež náleží zároveň i do skupiny kvantitativních metod), skenovací (rastrová) elektronová mikroskopie a konfokální laserová mikroskopie. Infračervená spektroskopie, kolorimetrie, chromatografické metody, gelová permeační chromatografie, vysoce účinná kapalinová chromatografie a PCR metody náleží do metod kvantitativních.

Výhody metod plotnových zahrnují rychlost a jednoduchost průkaznosti produkce EPS, ale bohužel výsledky metod tohoto typu jsou pouze orientační, jelikož tento způsob identifikace zachytí pouze kmeny BMK produkující velké množství EPS. Pravděpodobně nejefektivnějšími metodami kvalitativní analýzy jsou metody mikroskopické. Skenovací elektronová mikroskopie vyžaduje malé množství vzorku, ten však musí být dokonale vysušen, konfokální laserová mikroskopie je díky využití laseru jako zdroje světla velmi rychlá a přesná a umožňuje měřit přirozeně hydratované vzorky.

Z metod analýzy kvantitativní byla zmíněna metoda kolorimetrická, jež je rychlá, finančně nenáročná a dostatečně citlivá. V porovnání s metodou FTIR spektroskopie je však méně přesná. Ani jedna z metod však nedokáže rozlišit HoPS a HePS. Gelová permeační chromatografie (GPC) je o něco méně přesná a vyžaduje filtraci před samotnou analýzou, ale přesto umožňuje spolehlivé, rychlé a relativně jednoduché získání výsledků. Z chromatografických metod, které mohou být používány jak pro analýzu kvalitativní, tak i kvantitativní, byla zmíněna vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je vysoce přesná, avšak materiálově nákladnější. PCR metody jsou velmi citlivé a dokáží rozlišit HoPS a HePS, jsou však náročnější na provedení a s tím souvisí i zdlouhavost metody. Nevýhodou jsou též falešně pozitivní výsledky.

Téměř každá metoda má svoje výhody stejně tak, jako i nevýhody. Na základě shromážděných informací lze konstatovat, že hypotéza byla splněna. K nejefektivnějším a nejrychlejším metodám kvalitativní analýzy patří metody mikroskopické, které ani nejsou moc materiálově náročné. K nejvýhodnějším metodám kvantitativní analýzy pak patří metody FTIR spektroskopie či PCR.

5 SEZNAM LITERATURY

- Allison, S. D., Chang, B., Randolph, T. W., Carpenter, J. F. 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365. 289 – 298.
- Ariga, H., Urashima, T., Ito, M., Morizono, N., Kimura, T., Takahashi, S. 1992. Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* OR 901 isolated from commercial yoghurt. *Journal of Food Science*. 57(3). 625 - 628.
- Ayala-Hernández, I., Hassan, A., Goff, H. D., Mira de Orduña, Corredig, M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. *International Dairy Journal*. 18. 1109 - 1118.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., Moineau, S. 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Dairy Science*. 86. 407 - 423.
- Brown, J. M. 1998. *Molecular Spectroscopy*. Oxford University Press.
- Cavenaghi, M. A. 2000. Estudo da recuperação de frutose produzida na síntese enzimática “in vitro” de dextrana. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., a kol. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(11). 639 - 646.
- De Vuyst, I., Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 23. 153 - 177.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* 87. 951 – 962.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3). 250 - 356.
- Ebel, C., Eisenberg, H., Ghirlando, R. 2000. Probing protein-sugar interactions. *Biophysical Journal*. 78. 385 – 393.
- Enikeev, R. 2012. Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of kefir production. Samara State Technical University, Department of Food Technology, 443100 Samara, Russia. *Food Chemistry*.
- Esko, J. D. 1999. Bacterial Polysaccharides. In *Essentials of Glycomics*, 2nd ed., Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., Eds.; Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY. USA.
- Fairbridge, R. A., Willis, K. J., Booth, R. G. 1951. The direct colorimetric estimation of reducing sugars and other reducing substances with tetrazolium salts. *Biochemical Journal*. 49(4). 423 - 427.
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Review Microbiology*. 8. 623 – 633.
- Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., Simov, Z. I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. (9-10). 805 - 810.
- Garaj, J., Bustin, D., Hladký, Z. 1987. *Analytická chémie*. Bratislava. 1. vydání. 744 s. ISBN: 06355387.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., Gomez, E. 2000. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*. 18(7). 549 - 579.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 205. 31 - 36.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Elsoda, M. 2003. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. 13. 755 - 762.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Karsten, B. Q. 2002. Direct Observation of Bacterial Exopolysaccharides Using Confocal Scanning Laser Microscopy. Department of Food Science and Technology.

- Athens. GA 30602. USA. American Dairy Science Association. Journal Dairy Science. 85. 1705 - 1708.
- Hassan, A. N., J. F. Frank, M. A. Farmer, K. A. Schmidt, and S. I. Shalabi. 1995. Formation of yogurt microstructure and three- dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. Journal Dairy Science. 78. 2629 – 2636.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D. 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. Journal General Microbiology. 137. 69 - 79.
- Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P., Tomasz, A. 1994. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. Infection and Immunity. 62. 2715 – 2721.
- Holzbecher, Z., Churáček, J., Hejtmánek, M., Kotrlý, S., Ksandr, Z., Vláčil, F., Vrbský, J. 1987. Analytická chemie. Praha. 664 s. ISBN: 0461287.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S. 2001. Modelling and optimizaion of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. Applied Microbiology and Biotechnology. 57(5-6). 639 - 646.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S. 2003. Enhanced kefiran production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology. 100(1). 43 - 53.
- Churáček, J., Jandera, P., Krupčík, J., Polonský, J., Popl, M., Vláčil, F. 1990. Analytická separace látek. 1. vydání. Praha. 384 s. ISBN: 8003005698.
- Jiang, L. 2010. Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. Carbohydrate Polymers. 79(2). 414 - 417.
- Jolly, L., Stingle, F. 2001. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 11. 733 - 745.
- Jolly, L., Vincent, S. J. F., Duboc, P., Neeser, J. R. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 82. 367 - 374.
- Kalab, M. 1993. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. Food Structure. 12. 95 – 114.

- Kalab, M., Allan-Wojtas P., Phipps-Todd, B. E. 1983. Development of microstructure in set-style non fat yogurt. A review. *Food Structure*. 2. 51 – 66.
- Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D. A., Skaracis, G. N. 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*. 39(2). 249 - 256.
- Kalous, V. 1975. *Základy fyzikálně chemických metod*. Praha. 2. vydání. 480 s. ISBN: 0460375.
- Kalous, V., Feltl, L., Loub, J., Pavlíček, Z., Procházka, K., Vohlídal, J. 1987. *Metody chemického výzkumu*. Praha. 432 s. ISBN: 0461787.
- Klouda, P. 1996. *Moderní analytické metody*. Ostrava. 1. vydání. 204 s. ISBN: 8090215505.
- Krus, G. N., Chekulaeva, L. V., Shalygina, G. A., Tkal, T. K. 1988. *Technology of milk products*. Moscow: Agropromizdat.
- Kumar, A. S., Mody, K., Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*. 47. 103 - 117.
- Lee, K. M., Gilmore, D. F. 2005. Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design. *Process Biochemistry*. 40. 229 - 246.
- Lefier, D., Grappin, R., Pochet, S. 1996. Determination of fat, protein and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyser. *Journal of AOAC International*. 79. 711- 717.
- Looijesteijn, P. J., van Casteren, W. H. M., Tuinier, R., Doeswijk-Voragen, C. H. L., Hugenholtz, J. 2000. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *Journal Applied Microbiology*. 89. 116 – 122.
- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Broadbent, J. R. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*. 64. 2147 - 2151.
- Luinge, H. J., Hop, E., Lutz, E. T. G. 1993. Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 284. 419 - 433.

- Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., Kitamura, S. 2004. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefirano-faciens* WT-2BT. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(17). 5533 - 5538.
- Marcotte, L., Kegelaer, G., Sandt, C., Barbeau, J., Lafleur, M. 2007. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. *Analytical Biochemistry*. 361. 7 – 14.
- Martinez-Martinez, L., Timmerman, C., Fler, A., Verhoef, J. 1993. Chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes after stimulation with whole cells and cell-wall components of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*. 39. 196 – 203.
- Meisen, S., Wingender, J., Telgheder, U. 2008. Analysis of microbial extracellular polysaccharides in biofilms by HPLC. Part I: development of the analytical method using two complementary stationary phases. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 391. 993 - 1002.
- Messens, W., Neysens, P., Vansielegheem, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L. 2002. Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. 1431 - 1435.
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., Crescenzi, V. 1999. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(1). 69-74.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., Remaud-Siméon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11(9). 675 - 685.
- Nampoothiri, K. M. et al. 2003. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*. 38. 1513-1519.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*. 351. 81-82.
- Nwodo, U. U., Green, E., Okoh, A. I. 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. Applied and Environmental Microbiology Research Group (AEMREG), Department of Biochemistry and Microbiology. South Africa. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067.

- Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., de Jesus Affe, H. M., Nascimento, R., de Melo, I. S., de Abreu Roque, M. R., de Assis, S. A. 2012. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. ISSN 01012061.
- Petit, A. C. 2005. Modifications d'un exopolysaccharide biosynthétisé par une bactérie issue des écosystèmes hydrothermaux profonds. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (EN-SCR). s. 195. Ph.D. Thesis, Renne: Université de Rennes 1.
- Piermaria, J. A., De la Canal, M. L., Abraham, A. G. 2008. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*. 22(8). 1520 - 1527.
- Prasanna, P. H. P., Grandison, A. S., Charalampopoulos, D. 2012. Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk. *Food Research International*. 47. 6 – 12.
- Rimada, P. S., Abraham, A. G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*. 68(4). 653 - 661.
- Rimada, P. S., Abraham, A. G. 2003. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Lait*. 83(1). 79 - 87.
- Roger, O. 2002. Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens: Obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Paris. Paris 13. Biomatériaux. 189.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12. 163 – 171.
- Sanni, A. I., Onilude, A. A., Ogunbanwo, S. T., Fadahunsi, I. F., Afolabi, R. O. 2002. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Nigeria. *European Food Research and Technology*. 214. 405 - 407.
- Shih, I. L., Chen, L. D., Wu, J. Y. 2010. Levan production using *Bacillus subtilis natto* cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymers*. 82(1). 111 - 117.
- Schellhaass, S. M., and H. A. Morris 1985. Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with rropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Microstructure Journal*. 4. 279 – 287.
- Schembri, M. A., Dalsgaard, D., Klemm, P. 2004. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of Bacteriology*. 186. 1249 – 1257.

- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Boseo, M., Cescutti, P. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology*. 51. 105 - 111.
- Sockalingum, G. D., Bouhedja, W., Pina, P., Allouch, P., Bloy, C., Manfait, M. 1998. FT-IR spectroscopy as an emerging method for rapid characterisation of microorganisms. *Cellular and Molecular Biology*. 44. 261 - 269.
- Southgate, D. A. T. 1991. Selected methods. In D. A. T. Southgate (Ed.), *Determination of food carbohydrates*. London. Elsevier Applied Science. 99 – 144.
- Stewart-Tull, D. E. S. 1980. The immunological activities of bacterial peptidoglycans. *Annual Review Microbiology*. 34. 311 – 340.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno. ISBN: 9788021038417.
- Taniguchi, M., Nomura, M., Itaya, T., Tanaka, T. 2001. Kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under the culture conditions established by mimicking the existence and activities of yeast in kefir grains. *Food Science and Technology Research*. 7(4). 333 - 337.
- Taylor, K. A. C. C. 1995. A modification of the phenol/sulphuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 53. 207 - 214.
- Teggatz, J. A., and H. A. Morris. 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Structure*. 9. 133 – 138.
- Tuinier, R., van Casteren, W. H. M., Looijesteijn, P. J., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Zoon, P. 2001. Effects of structural modification on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers* 59. 160 - 166.
- Van der Mei, H. C., Noordmans, J., Busscher, H. J. 1989. Molecular surface characterization of oral streptococci by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 991. 395 - 398.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., De Vuyst, L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Research Group of Industrial Microbiolo-*

- gy and Food Biotechnology (IMDO), Department of Applied Biological Sciences and Engineering, Vrije Universiteit Brussel, Belgium. *International Journal of Food Microbiology*. 118. 250 - 258.
- Van Dilla, M. A., Langlois, R. G., Pinkel, D., Yajko, D., Hadley, W. K. 1983. Bacterial characterization by flow cytometry. *Science*. 220. 620 - 622.
- Van Marle, M. E., Zoon, P. 1995. Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels. *Netherlands Milk Dairy Journal*. 49. 47 – 65.
- Vandamme, E. J., De Baets, S., Steinbüchel, E. 2002. *Biopolymers, Polysaccharides I Polysaccharides from prokaryotes* Wiley-VCH.
- Vandenberg, D. J. C., Smits, A., Pot, B., Ledebøer, A. M., Kersters, K., Verbakel, J. M. A., Verrips, C. T. 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnology*. 7. 189 - 205.
- Vanhooren, P. T., Vandamme, E. J. 1998. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Rec. Res. Development of Fermentation Bioengineering*. 1. 253 – 299.
- Verhoef, R., Schols, H. A., Blanco, A., Siika-aho, M., Rättö, M., Buchert, J., Lenon, G., Voragen, A. G. J. 2005. Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill slime deposits. *Biotechnology and Bioengineering*. 91. 91 - 105.
- Vermani, M. V.; Kelkar, S. M.; Kamat, M. Y. 1995. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80. 599 - 602.
- Voříšek, J. a kol. 1965. *Analytická chemie*. Praha. 268 s. ISBN: 0702965.
- Welman, A. D., Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*. 21. 269 - 274.
- Wilson, E. B., Decius, J. C., Cross, P. C. 1980. *Molecular Vibrations*, Dover.
- Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming H. C. 2001. *Methods Enzymol*. 336. 302 – 314.

Wu, S., Jin, Z., Kim, J. M., Tong, Q., Chen, H. 2009. Downstream processing of pullulan from fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*. 77(4). 750 - 753.

Yokoi, H., Watanabe, T. 1992. Optimum culture conditions for production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 74(5). 327 - 329.

Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Eilers, H., Burkill, P. H., Amann, R. 1999. Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 65. 3251 - 3257.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BMK = bakterie mléčného kvašení

CLM = konfokální laserová mikroskopie

CPS = kapsulární polysacharidy

EDTA = ethylendiamintetraoctová kyselina

EPS = exopolysacharidy

EPS⁻ = exopolysacharidy neprodukující

EPS⁺ = exopolysacharidy produkující

FTIR = Fourier transform infrared (Fourierova transformační infračervená spektroskopie)

GPC = gelová permeační chromatografie

HePS = heteropolysacharidy

HoPS = homopolysacharidy

HPLC = vysoce účinná kapalinová chromatografie

SEM = skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie